



**Sara da Encarnação Amaro Monteiro**

Bacharel em Biologia Marinha

## **Avaliação da qualidade microbiológica de saladas prontas para consumo comercializadas na região de Lisboa**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho  
Duarte, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Co-Orientador: Mestre Katelene Soraia Pereira Lima

Júri:

Presidente: Professora Doutora Benilde Simões Mendes

Arguente: Professora Doutora Elisabete Muchagato Maurício

Vogal: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



**FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro 2016**





**Sara da Encarnação Amaro Monteiro**

Bacharel em Biologia Marinha

## **Avaliação da qualidade microbiológica de saladas prontas para consumo comercializadas na região de Lisboa**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho  
Duarte, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Co-Orientador: Mestre Katelene Soraia Pereira Lima

Júri:

Presidente: Professora Doutora Benilde Simões Mendes

Arguente: Professora Doutora Elisabete Muchagato Maurício

Vogal: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



**Setembro 2016**

“Avaliação da qualidade microbiológica de saladas prontas para consumo comercializadas na região de Lisboa” Copyright © Sara da Encarnação Amaro Monteiro, FCT-UNL.

Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

# Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela capacitação, pela força, e pela esperança ao longo da minha vida estudantil. Toda honra e toda glória seja dada ao grande Deus.

Agradeço imensamente a minha estimada orientadora, professora Dr.<sup>a</sup> Maria Paula Duarte, pelo voto de confiança, pelo incentivo, pela orientação e acima de tudo pelo amor e pelo carinho incondicional.

Um especial agradecimento à Professora Doutora Coordenadora do Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar da FCT-UNL, pela receptividade, pelo apoio e por todo afeto concedido em mim.

O meu muito obrigado vai também a Katelene Lima pela orientação e pela determinação dos estudos práticos.

Agradeço profundamente ao José Teixeira Gonçalves pela disponibilidade, pela orientação e pelo apoio na realização desta dissertação.

O meu muito obrigado também é extensivo a todos os docentes do Mestrado de Tecnologia e Segurança Alimentar, pela dedicação incansável em transmitir os conhecimentos e gerarem em mim uma vontade crescente em aprofundar os mesmos.

O meu Voto de agradecimento também é direcionado ao Diretor provincial da Educação do Namibe-Angola, Pacheco Francisco pelo voto de confiança, pelo incentivo e pela dispensa que permitiram que este sonho se tornasse uma realidade.

Agradeço também imensamente a minha família pela confiança, pelo apoio incondicional e pela presença ao longo deste período importantíssimo da minha vida.

Um agradecimento especial a Direção da SASNOVA pelo acompanhamento e pela ajuda prestada.

O meu muito obrigado é também extensivo aos meus amigos que de uma forma direta ou indiretamente contribuíram para que esta dissertação se tornasse uma realidade, nomeadamente ao casal Priosti, Antónia Alexandre, Celso Mandume, Carla Bran, Isaque Herculano, Isata Lemba, Deias Prazeres, Manuel Brito, Panda Neto, Ambrósio Kamuele, Daniel Tito, Madalena Paulo, Noé António, Veronika Pohorencová, Micael Cruz, Emir Veloso, José Moniz, Pedro Nzi-la, Patrícia Paulo, Karén Miranda, Catarina Bouça, Alexandra Pombeiro, Marisa Costa, Lisa Costa, Filipa Ribeiro, Domingos Semedo, António Java, Júlio Gabriel, Alda Lisboa, Carlos Java, Jorge Bonga e Tchibwabwa Barros.

## Resumo

No presente trabalho analisaram-se amostras de saladas minimamente processadas (salada Ibérica, camponesa de alface iceberg e de alface frisada) com o objetivo de aferir o seu grau de conformidade com os Valores Guia fixados pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge para saladas prontas a consumir. Durante os meses de julho e setembro de 2016, um total de 37 amostras de saladas minimamente processadas, compostas principalmente por alface ou combinações de alface e rúcula, acompanhada de cenoura ripada, couve roxa ripada e milho foram coletadas de diferentes supermercados na região de Lisboa (Portugal). A enumeração e determinação dos microrganismos foi efetuada de acordo as normas ISO (Organização Internacional de Normalização). Este padrão internacional especifica métodos horizontais para a enumeração e determinação de diferentes microrganismos e é aplicável aos produtos alimentícios destinados ao consumo humano e ao consumo de animais. Foram realizadas análises microbiológicas para a enumeração de microrganismos totais a 30 °C, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva (*S. aureus* e outras espécies), *Bacillus cereus*, bactérias anaeróbias sulfitos redutoras, bolores e leveduras.

Todas as amostras analisadas de salada ibérica, camponesa, alface iceberg e alface frisada apresentaram um índice elevado de contaminação para microrganismos aeróbios totais a 30 °C e coliformes totais. Relativamente à presença de leveduras, bolores, *Escherichia coli* e bactérias anaeróbias sulfito-redutoras, a maioria das amostras analisadas apresentaram, resultados aceitáveis ou satisfatórios. No caso particular da *E. coli*, único dos parâmetros analisados com limite legal imposto pelo Regulamento no.1441/2007, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, todas as amostras analisadas se apresentaram conformes. Em relação aos patogénicos pesquisados, nomeadamente *Staphylococcus* coagulase positiva (*S. aureus* e outras espécies) e *Bacillus cereus* também se verificou um número elevado de amostras não satisfatórias. Contudo, estes resultados são apenas indicativos uma vez que, no caso dos *B. cereus* não se procedeu à confirmação das colónias presuntivas, e no caso dos *Staphylococcus* coagulase positiva o método utilizado não foi o mais indicado para este tipo de amostras. Os resultados obtidos neste estudo apontam para uma fraca qualidade das saladas minimamente processadas analisadas no que diz respeito ao nível de microrganismos totais a 30 °C e de coliformes totais. Apesar destas contagens não se correlacionarem diretamente com a presença de toxinas ou de agentes patogénicos, o facto de serem elevadas sugere que seja necessário implementar melhores condições de higiene durante a fase de processamento, armazenagem e distribuição.

**Palavras-Chave:** Saladas Minimamente Processadas, Segurança Alimentar, Análise Microbiológica, Salada Frisada, Salada Iceberg, Salada Ibérica e Salada Camponesa

# Abstract

In the present work, samples of minimally processed salads were analyzed in order to assess their degree of compliance with the Guideline Values for ready-to-eat salads set by the Ricardo Jorge National Health Institute. During the months of July and September 2016, a total of 37 samples of minimally processed salads, composed mainly of lettuce or combinations of lettuce and arugula, accompanied by sliced carrots, purple cabbage and corn, were collected from different supermarkets in the region of Lisbon (Portugal). The enumeration and determination of the microorganisms was in accordance with ISO (International Organization for Standardization) standards. This international standard specifies horizontal methods for the enumeration and determination of different micro-organisms and applies to food products intended for human consumption and animal consumption. Microbiological analyzes were performed to enumerate total microorganisms at 30 ° C, total coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positive (*S. aureus* and other species), *Bacillus cereus*, anaerobic sulfite reducing bacteria, molds and yeasts.

All analyzed samples showed a high contamination index for total aerobic micro-organisms at 30 ° C and total coliforms. Regarding the presence of yeasts, molds, *Escherichia coli* and anaerobic sulfite reducing bacteria, most of the analyzed samples presented acceptable or satisfactory results. In the particular case of *E. coli*, which is the only one of the parameters analyzed with a legal limit imposed by Regulation No.1441 / 2007, all the samples analyzed were in compliance. In relation to the pathogens studied, namely *Staphylococcus* coagulase positive (*S. aureus* and other species) and *Bacillus cereus*, a large number of unsatisfactory samples were also observed. However, these results are only indicative because, in the case of *B. cereus*, no presumptive colonies were confirmed, and in the case of *Staphylococcus* coagulase positive, the method used was not the most appropriate for this type of samples. The results obtained in this study point to a poor quality of the ready-to-eat salads analyzed with respect to the level of total micro-organisms at 30 ° C and of total coliforms. Although these counts do not correlate directly with the presence of toxins or pathogens, the results obtained suggests that better hygiene conditions need to be implemented during the processing, storage and distribution phases.

**Keywords:** Minimally Processed Products, Food Safety, Microbiological Analysis, Beaded Salad, Iceberg Salad, Iberian Salad and Peasant Salad.

# Lista de abreviaturas e siglas

<b>BP</b>	Boas Práticas
<b>MP</b>	Minimamente Processados
<b>BD</b>	<i>Business Dictionary</i>
<b>CDC</b>	Centro de Controlo e Prevenção de Doenças
<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i>
<b>INSA</b>	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>EUFI</b>	<i>Europa Food Information Council</i>
<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i>
<b>HACCP</b>	Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos ( <i>Hazard Analysis Critical Control Points</i> )
<b>Arla</b>	<i>Association of Residential Letting Agents</i>
<b>BPA</b>	Boas Práticas Agrícolas
<b>GVPs</b>	Boas Práticas Veterinárias
<b>BPF</b>	Boas Práticas de Fabrico
<b>BPH</b>	Boas Práticas de Higiene
<b>MDH</b>	<i>Minnesota Department of Health</i>
<b>VDH</b>	<i>Vermont Department of Health</i>
<b>BFHD</b>	<i>Benton Franklin Health District</i>
<b>NHS</b>	<i>National Health Service</i>
<b>WRC</b>	<i>Water Research Center</i>
<b>MBL</b>	<i>Murray-Brown Laboratories</i>
<b>PE</b>	Portal Educação
<b>NRA</b>	<i>National Restaurant Association</i>
<b>a<sub>w</sub></b>	Actividade de Água
<b>pH</b>	Potencial Hidrogénico
<b>Eh</b>	Potencial de Oxidação-Redução



# Índice Geral

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Perigos Alimentares</b>	<b>2</b>
1.1.1	Bactérias	2
1.1.2	Fungos	3
1.1.3	Vírus	3
1.1.4	Parasitas	4
<b>1.2</b>	<b>Doenças transmitidas por alimentos</b>	<b>4</b>
1.2.1	Fatores associados a toxinfecções alimentares	7
<b>1.3</b>	<b>Doenças de origem alimentar em Portugal</b>	<b>7</b>
<b>1.4</b>	<b>A Segurança alimentar</b>	<b>10</b>
<b>1.5</b>	<b>Contaminação cruzada</b>	<b>11</b>
<b>1.6</b>	<b>Fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam o crescimento microbiano</b>	<b>12</b>
1.6.1	Atividade da água ( $a_w$ )	12
1.6.2	Acidez do alimento (pH)	13
1.6.3	Composição química do alimento	14
1.6.4	Potencial de oxidação-redução (Eh)	14
1.6.5	Estrutura biológica do alimento	15
1.6.6	Substâncias antimicrobianas naturais presentes no alimento	15
1.6.7	Temperatura	16
1.6.8	Humidade relativa e atmosfera gasosa	16
<b>1.7</b>	<b>Produtos Hortofrutícolas minimamente processados</b>	<b>17</b>
1.7.1	Fluxograma de processamento mínimo dos hortofrutícolas	18
1.7.2	Controlo de perigos Biológicos em produtos minimamente processados	20
1.7.3	Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de vegetais prontos a consumir	22
1.7.3.1	Microrganismos aeróbios totais a 30°C	22
1.7.3.2	Leveduras	22
1.7.3.3	Bolores	22
1.7.3.4	Coliformes Totais	23
1.7.3.5	<i>Escherichia coli</i>	24
1.7.3.6	<i>Listeria monocytogens</i>	25
1.7.3.7	Bactérias anaeróbias sulfito-redutoras	26

1.7.3.8	<i>Staphylococcus aureus</i>	26
1.7.3.9	<i>Bacillus cereus</i>	27
1.7.3.10	<i>Salmonella</i> spp	28
1.7.4	Contexto e Motivação	28
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Recolha de Amostras</b>	<b>29</b>
<b>2.2</b>	<b>Preparação de soluções e meios de cultura</b>	<b>29</b>
2.2.1	Solução de peptona-sal	29
2.2.2	Meio Triptona-bilis X-glucurónico (TBX-BioKar)	29
2.2.3	Meio Baird-Parker RPF Agar (BioKar)	30
2.2.4	Meio Plate Count Agar (PCA -BioKar )	31
2.2.5	Meio Violet Red Bile Agar (VRBL-Biokar)	32
2.2.6	Caldo Bilis Verde Brilhante (BGBB-Biokar)	32
2.2.7	Meio Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBCA- BioKar)	33
2.2.8	Meio Bacillus cereus Agar (BCA-BioKar)	33
2.2.9	Meio Triptona Sulfito Cicloserina Agar (TSC-BioKar)	34
<b>2.3</b>	<b>Métodos de enumeração e determinação dos microrganismos</b>	<b>35</b>
2.3.1	Método horizontal de enumeração de <i>Escherichia coli</i> de acordo com a ISO 16649-2:2001.	35
2.3.2	Método horizontal de enumeração de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva de acordo com a ISO 6888-02:1999.	36
2.3.3	Método horizontal de enumeração de Microrganismos totais a 30°C, segundo a ISO 4833-1:2013	36
2.3.4	Método horizontal de enumeração de bactérias coliformes de acordo com a ISO 4832:2006.	36
2.3.5	Método horizontal de enumeração de <i>Bacillus cereus</i> de acordo com a ISO 7932:2004.	37
2.3.6	Método horizontal de enumeração de Bolores e leveduras de acordo com a ISO 21527-1:2008.	37
2.3.7	Método horizontal de enumeração de Bactérias anaeróbias sulfito-redutoras de acordo com a ISO 15213:2003.	37
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>RESULTADOS DAS AMOSTRAS ANALISADAS</b>	<b>39</b>
3.1.1.	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	45

3.1.2	<i>Escherichia coli</i>	46
3.1.3	Bolores e leveduras	47
3.1.4	Microrganismos aeróbios totais a 30°C	49
3.1.5	Bactérias anaeróbias sulfito-redutoras	50
3.1.6	<i>Bacillus cereus</i>	51
3.1.7	Coliformes totais	52
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>53</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>55</b>

# Índice de Figuras

<i>Figura 1.1 fatores contributivos das toxinfecções alimentares entre 2009-2013 .....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 1.2. Agentes causais dos surtos de doença alimentar ocorridos em Portugal entre 2009 e 2013.....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 1.3 Valores aproximados de pH para o crescimento de alguns microrganismos nos alimentos .....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 1.4 Etapas gerais do processamento mínimo de produtos hortofrutícolas .....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 3.1. Contribuição de cada um dos parâmetros microbiológicos determinados para o total de resultados não satisfatórios/potencialmente perigosos obtidos com cada um dos tipos de salada analisados.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 3.2. Percentagem de resultados satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis/potencialmente perigosos de Staphylococcus coagulase positivos nas várias amostras de saladas prontas-a-consumir analisadas.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 3.3. Percentagem de resultados satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis/potencialmente perigosos de E. coli nas várias amostras de saladas prontas-a-consumir analisadas.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 3.4. Percentagem de resultados satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis/potencialmente perigosos de bolores nas várias amostras de saladas prontas-a-consumir analisadas.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 3.5. Percentagem de resultados satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis/potencialmente perigosos de leveduras nas várias amostras de saladas prontas-a-consumir analisadas.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 3.6. Percentagem de resultados satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis/potencialmente perigosos de Microrganismos aeróbios totais a 30°C nas várias amostras de saladas prontas-a-consumir analisadas.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 3.7 Percentagem de resultados satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis/potencialmente perigosos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras nas várias amostras de saladas prontas-a-consumir analisadas.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 3.8 Percentagem de resultados satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis/potencialmente perigosos de Bacillus cereus nas várias amostras de saladas prontas-a-consumir analisadas.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 3.9 Percentagem de resultados satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis/potencialmente perigosos de coliformes totais nas várias amostras de saladas prontas-a-consumir analisadas.....</i>	<i>52</i>

# Índice de Tabelas

<i>Tabela 1.1. Caraterísticas das principais doenças causadas por bactérias em alimentos .....</i>	<i>6</i>
<i>Tabela 1.2. Surtos com agente etiológico identificado em alimentos, período- 2008-2014 .....</i>	<i>8</i>
<i>Tabela 1.3. Valores mínimos de atividade de água para o crescimento de microrganismos patogénicos em alimentos .....</i>	<i>13</i>
<i>Tabela 1.4. Temperatura mínimas de crescimento de microrganismos patogénicos em alimentos. ....</i>	<i>16</i>
<i>Tabela 3.1. Resultados das análises microbiológicas das saladas ibéricas (alface verde, alface roxa e rúcula selvagem) .....</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 3.2. Resultados das análises microbiológicas das saladas camponesas (alface, cenoura ripada, milho e couve roxa ripada) .....</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 3.3. Resultado das análises microbiológicas das saladas iceberg (alface iceberg) .....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 3.4. Resultados das análises microbiológicas das saladas frisadas (alface frisada) .....</i>	<i>42</i>



## Introdução

Com as novas imposições da sociedade, as nossas necessidades e hábitos alimentares também mudaram. Realmente, hoje temos ao nosso dispor uma grande variedade de alimentos ao longo do ano em que muitos desses alimentos percorreram muitos quilômetros para que tivéssemos acesso. Entretanto as exigências do nosso dia-a-dia não nos possibilitam muito tempo para a confecção das nossas refeições o que tem contribuído muito para o consumo de alimentos pré-cozinhados, bem como para a maior frequência de refeitórios e restaurantes, o que pode constituir um risco por aumentar o tempo entre a preparação e o consumo dos alimentos (Afonso, 2008).

Apesar dos avanços tecnológicos nas áreas de produção e controle de alimentos, os casos de doenças de origem alimentar têm sido considerados como um grave problema de saúde pública a nível mundial (Mallon & Bortolozo, 2004; Cunha, 2009). Durante o manuseamento e o processamento os alimentos podem ser facilmente infetados por microrganismos e se as condições forem favoráveis (fatores intrínsecos e fatores extrínsecos), os alimentos poderão servir de meio para o desenvolvimento desses microrganismos, o que pode levar não só ao desenvolvimento de doenças de origem alimentar, mas também à alteração das características orgânicas e à deterioração do próprio alimento (Cunha, 2009).

Durante a fase de processamento os alimentos podem também ser infetados devido a limpeza inconveniente dos equipamentos, uso de material de limpeza inadequado, conservação imprópria ou ainda devido a infestação de insetos e roedores. A Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que mais de 70% dos incidentes de doenças de origem alimentar ocorrem durante o manuseamento inadequado pelo consumidor final (Almeida, 1998).

Nos últimos anos a preocupação com a segurança alimentar vem aumentando significativamente, originando debate entre as organizações governamentais, as indústrias alimentares e as instituições de ensino superior sobre formas de assegurar o controle de qualquer perigo tan-

to físico, químico como biológico ao longo de toda cadeia alimentar, pois que a inocuidade dos alimentos tem de abranger aspetos que vão desde o prado, isto é onde os alimentos são produzidos, até ao prato do consumidor (Almeida, 1998; Mallon & Bortolozo, 2004).

## **1.1 Perigos Alimentares**

A Comissão *Codex Alimentarius* definiu um perigo como qualquer contaminante físico, químico ou biológico, presente nos géneros alimentícios com capacidade de causar dano para a saúde, seja este um transtorno funcional ou mesmo a morte (Guerra, 2015). Afonso (2008) descreve que um perigo é a presença de uma taxa inadmissível de um contaminante físico, químico ou biológico num género alimentício com capacidade de causar um efeito nocivo ao consumidor.

Os perigos biológicos são os que normalmente apresentam maior risco para a inocuidade dos alimentos, devido à sua ubiquidade e à facilidade com que muitos deles se podem multiplicar nos alimentos. Assim, do ponto de vista de saúde pública, os perigos biológicos são os mais graves, visto serem responsáveis pela maioria dos surtos de origem alimentar (Afonso, 2008; Guerra, 2015). Este grupo de perigos inclui os vírus, bactérias, parasitas, fungos e priões. Naturalmente estes microrganismos estão relacionados com as matérias-primas e o ambiente (ar e água), bem como com os manipuladores. Assim, uma das formas de prevenir a transmissão deste tipo de perigos é através da higiene pessoal dos manipuladores de alimentos (Baptista & Venâncio, 2003; Baptista & Linhares, 2005).

Apesar da presença dos microrganismos nos alimentos se encontrar mais associada aos efeitos negativos que estes podem provocar, em alguns casos a sua presença é desejável. Exemplos desta situação são as bactérias utilizadas na produção do iogurte, de alguns fungos usados na produção de queijos ou das leveduras responsáveis pela elaboração do vinho, da cerveja ou do pão (Baptista & Venâncio, 2003; Guerra, 2015).

### **1.1.1 Bactérias**

As bactérias são organismos procariotas e unicelulares que se encontram naturalmente no ambiente e podem ser transmitidas para os alimentos por meio de animais, da água, do vento, do solo, de plantas e do Homem. Desta forma as bactérias podem ser localizadas nas matérias-primas utilizadas no fabrico de produtos alimentares. Quando as bactérias entram em contacto com os alimentos, se houver condições favoráveis que lhes permitam a sua permanência e o seu desenvolvimento então poderá ocorrer a sua proliferação. O manuseamento ou a conservação inconveniente dos produtos alimentares contribuem para a propagação desses microrganismos ao longo da cadeia alimentar e, deste modo, para o aumento de risco para o consumidor (Baptista & Venâncio, 2003).

As bactérias, pela sua variedade e patogenia, formam o grupo microbiano mais frequentemente relacionado com as doenças transmitidas pelos alimentos (Pinto, 1996). As bactérias patogénicas



cas são as principais responsáveis pelas toxinfecções alimentares. Dentro deste grupo de perigos biológicos destacam-se a *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*. Algumas destas espécies de bactérias produzem toxinas e têm a capacidade de formar esporos que lhes permitem a sobrevivência em diversos ambientes menos favoráveis (Ribeiro-Furtini et al., 2006; Afonso, 2008; Guerra, 2015).

### 1.1.2 Fungos

Os fungos são organismos eucariotas e incluem as leveduras (organismos unicelulares) e os bolores (organismos pluricelulares). Os fungos crescem facilmente em alimentos como frutas, sumos de frutas, queijos, alimentos salgados, vegetais, cereais e alimentos secos. O perigo relacionado com os fungos é bastante preocupante quando se trata de espécies produtoras de micotoxinas (fungos filamentosos) que são prejudiciais para a saúde humana e animal. Entre estes podemos citar os géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, e *Penicillium* (Pinto, 1996; Jay et al., 2005).

Apesar de não constituírem um problema de saúde pública, uma vez que na sua maioria não são patogénicas, as leveduras são igualmente responsáveis por perdas de alimentos, podendo contribuir de forma muito significativa para a sua deterioração. Dentro das leveduras causadoras de deterioração dos alimentos encontram-se espécies dos géneros *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* e *Rhodotorula* (Baptista & Venâncio, 2003; Jay et al., 2005).

### 1.1.3 Vírus

Os vírus são constituídos por moléculas de ácidos nucleicos revestidas por proteínas. O homem pode ser infetado por vírus através da ingestão de alimentos ou de água contaminada. Estes perigos biológicos não se multiplicam nem sobrevivem por longos prazos em alimentos, pois que são incapazes de se reproduzir fora de uma célula viva. Em geral as fezes e a urina de indivíduos infetados, assim como a água contaminada são as fontes de viroses que infetam os alimentos. Portanto, os alimentos envolvidos em surtos virais são geralmente os pescados e os vegetais crus. Exemplos de vírus associados a doenças de origem alimentar são o vírus da hepatite A, os vírus tipo Norwalk, rotavírus, astrovírus, calicivírus e adenovírus entéricos (Baptista & Venâncio, 2003; Baptista & Linhares, 2005).

#### 1.1.4 Parasitas

Os parasitas são organismos que necessitam sempre de um hospedeiro para se poderem alimentar, desenvolver e multiplicar. Os parasitas variam desde organismos unicelulares, como os protozoários, até animais pluricelulares como os helmintas (Baptista & Linhares, 2005).

Segundo Baptista & Venâncio (2003), as infestações parasitárias estão relacionadas basicamente com os produtos alimentares mal cozinhados ou alimentos prontos para o consumo contaminados. Naturalmente os parasitas são específicos para cada hospedeiro. Os parasitas que podem encontrar no homem um hospedeiro são a *Trichinella spiralis*; *Toxoplasma gondii*; *Diphyllobothrium spp*; *Entamoeba histolytica*; *Cryptosporidium parvum*; *Anisakis simplex*; *Eustrongylides spp*; *Taenia saginata*; *Pseudoterranova decipiens*; *Taenia solium*; *Giardia lamblia*; *Fasciola hepatica*; *Cyclospora cayetanensis*; *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* (Baptista & Linhares, 2005).

A contaminação dos alimentos com os parasitas pode ocorrer através dos manipuladores ou a partir de água contaminada. Para além das boas práticas de higiene na preparação dos alimentos e da utilização de água potável, também o processamento térmico e, em alguns casos, a congelação, podem ajudar a minimizar os riscos (Jay *et al.*, 2005).

### 1.2 Doenças transmitidas por alimentos

Os alimentos de origem animal ou vegetal, processados ou frescos, incluindo os líquidos, podem servir de veículo de transmissão de doenças através dos microrganismos patogénicos (bactérias, fungos, vírus ou parasitas), capazes de causar diversos distúrbios fisiológicos nas pessoas que os ingerem. As doenças de origem alimentar acontecem quando uma ou mais pessoas contraem uma enfermidade devido à ingestão de alimentos ou de líquidos contaminados com microrganismos ou toxinas indesejáveis (Forsythe, 2002).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças nos Estados Unidos afirma que as doenças de origem alimentar são ocorrências em que duas ou mais pessoas apresentam os mesmos sintomas da doença, após o consumo de um mesmo alimento e em que as análises epidemiológicas apontem o alimento como a origem da doença. Segundo a mesma fonte “Quando duas ou mais pessoas têm a mesma doença a partir do mesmo alimento ou bebida contaminada, o evento é chamado de um surto de doenças transmitidas por alimentos” (CDC, 2016). Geralmente os vômitos, as diarreias, as náuseas, as dores abdominais, as dores de cabeça são sintomas desencadeados por doenças de origem alimentar. Esse tipo de enfermidade afeta certos grupos de risco com mais frequência. Esses grupos de risco incluem crianças, idosos, gestantes e pessoas imunocomprometidas (Trindade, 2014). Tecnicamente as doenças de origem alimentar classificam-se em três tipos de doenças denominadas por infeções, intoxicações e toxoinfeções alimentares.

As infecções alimentares ocorrem por meio de ingestão de alimentos infetados com perigos biológicos que têm em si mesmo capacidade de causar doença. Assim, as infecções alimentares ocorrem quando os microrganismos conseguem chegar ao intestino delgado e aí se reproduzem e desenvolvem dando lugar ao aparecimento de sintomas. Por outro lado, as intoxicações alimentares sucedem quando os perigos biológicos presentes no alimento produzem toxinas no mesmo alimento que, ao serem ingeridas, originam o aparecimento dos sintomas. Neste caso, não são os microrganismos que originam os sintomas mas sim as suas toxinas (Soares, 2007). Finalmente as toxinfecções alimentares identificam os casos em que se ingere um alimento contaminado por microrganismos patogénicos e estes produzem as toxinas no intestino.

As doenças de origem alimentar resultam da ingestão de alimentos contaminados por perigos biológicos como vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintas ou toxinas por eles produzidas e constituem uma das causas de mortalidade a nível mundial (Viegas et al., 2015; EFSA, 2015).

O período de incubação é normalmente muito mais reduzido nas intoxicações alimentares, pois que as toxinas logo que chegam ao aparelho gastrointestinal dão origem ao aparecimento dos sintomas, que podem ocorrer depois de uma a duas horas ou mesmo 30 minutos após a ingestão. No caso das infeções, as bactérias necessitam de tempo para se desenvolverem e os sintomas podem ocorrer depois de dias ou mesmo semanas (Soares, 2007).

As enfermidades de origem alimentar constituem um problema de saúde pública comum a todos os países, incluindo os mais desenvolvidos, estimando a OMS que o conhecimento oficial do número deste tipo de doenças corresponda apenas a 10% do total. A elevada prevalência destas doenças pode resultar de inúmeros fatores que incluem as práticas do comércio internacional, as técnicas de produção intensiva de alimentos, mudanças de hábitos alimentares resultantes de mudanças do estilo de vida ou o aumento do tempo de prateleira dos produtos (Soares, 2007).

A tabela 1.1. apresenta de forma sistemática, as principais características das enfermidades associadas aos principais perigos biológicos que podem estar presentes em géneros alimentícios.

**Tabela 1.1. Características das principais doenças causadas por perigos biológicos em alimentos (FDA, 2016)**

Perigo	Período de incubação	Doença	Sintomas	Duração dos sintomas	Alimentos associados
<i>Bacillus cereus</i>	10 a 16 horas	Diarreia e vômitos	Diarreia aquosa, náuseas e cólicas abdominais	24 a 48 horas	Carne, pescado, leite, pudins, saladas, pastéis e sopas
<i>Campylobacter jejuni</i>	2 a 5 dias	Campilobacteriose	Diarreia, febre, dores abdominais e vômitos	2 -a 10 dias	Carne de aves mal cozida, leite não pasteurizado e água contaminada
<i>Clostridium botulinum</i>	12 a 72 horas	Botulismo	Fraqueza muscular, vertigens, diarreia, vômitos e boca seca	Variável	Alimentos enlatados, alimentos armazenados em anaerobiose
<i>Clostridium perfringens</i>	8 a 16 horas	Intoxicação por perfringens	Dores abdominais e diarreia aquosa	24 horas	Pescado salgado, frango e alimentos pré-cozidos
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	1 a 8 dias	Cólica hemorrágica	Dor abdominal, vômitos e diarreia com sangue	5 a 10 dias	Leite cru, carne bovina mal cozida, hambúrguer, vegetais, água contaminada e frutas cruas
<i>Listeria monocytogenes</i>	9 horas a 2 semanas	Listeriose	Infeção intra-uterina ou cervical em gestantes, febre, náusea, dores musculares, diarreia e meningite	Variável	Queijos, leite cru, frango, carnes cruas, gelado e vegetais crus
<i>Norovírus</i>	12 a 48 horas	Gastroenterite	Náusea, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, febre e dor de cabeça	12 a 60 horas	Água contaminada e vegetais
<i>Salmonella spp</i>	6 a 48 horas	Salmonelose	Vômitos, diarreia, cólicas abdominais e febre	4 a 7 dias	Frango, carne crua, ovos, leite, queijo, frutas e legumes crus
<i>Shigella spp</i>	4 a 7 dias	Shigelose	Fezes com sangue e muco, diarreia, dores abdominais e febre	24 a 48 horas	Saladas, atum, vegetais crus, camarão e água
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 a 6 horas	Intoxicação estafilócica	Náusea, vômitos, cólicas abdominais, diarreia e febre	24 a 48 horas	Carnes e derivados, batata, saladas de ovos, bolos e cremes
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4 - 96 horas	Infeção por <i>V. parahaemolyticus</i>	Diarreia, cólicas abdominais, náuseas, vômitos e febre	2 a 5 dias	Pescados e mariscos
<i>Vibrio vulnificus</i>	1 a 7 dias	Infeção por <i>V. vulnificus</i>	Vômitos, dores abdominais, diarreia, febre e úlceras	2 a 8 dias	Água, pescado cru e crustáceos
<i>Yersinia enterocolitica</i>	24 a 48 horas	Yersiniose	Diarreia, dor abdominal, vômitos e febre	Variável	Carne suína, bovina, pescado, ostras e leite cru

### **1.2.1 Fatores associados as toxinfecções alimentares**

Os fatores que mais cooperam para os riscos alimentares encontram-se, naturalmente, relacionados com o incumprimento de boas práticas de higiene (BFH) e boas práticas de fabrico (BPF) que visam garantir a segurança dos alimentos. Dentro destes fatores destacam-se a conservação dos alimentos à temperatura ambiente; Fornecimento de produtos alimentares de fontes inseguras; Alimentos preparados com muita antecedência; Preparação dos alimentos em grandes porções; Equipamentos infetados; Temperatura de confeção de alimentos inadequada; Deficiente higiene pessoal; Procedimentos inconvenientes para o arrefecimento, manutenção a quente e congelação dos géneros alimentícios (Afonso, 2008).

Para que ocorra uma doença de origem alimentar é necessário que o microrganismo patogénico ou a sua toxina estejam presentes no alimento, podendo ser necessário que ocorram as seguintes condições (Baptista & Venâncio, 2003):

- O microrganismo causador de doença se encontre em número suficiente para provocar uma infeção ou produzir toxinas;
- O alimento seja apto para suportar o crescimento dos microrganismos patogénicos;
- O alimento permaneça na zona de risco de temperatura por período suficiente para que o microrganismo se multiplique ou produza toxina;
- Seja consumida uma quantia suficiente do alimento de maneira a superar a entrada de suscetibilidade do indivíduo que ingere o alimento.

O aparecimento de infeções deve-se à interação entre o microrganismo, o alimento em que este se encontra e a vulnerabilidade do indivíduo. Assim, a dose infecciosa varia não só com o tipo de microrganismo mas também com características do alimento e do hospedeiro, sendo que, conforme já anteriormente referido, as crianças, os idosos, as grávidas e os doentes imunocomprometidos são, por norma, os grupos mais suscetíveis (Trindade, 2014).

Assim, o aparecimento de doenças de origem alimentar depende de fatores como o potencial do patogénico em originar doença, da interação entre o microrganismo patogénico e outros microrganismos presentes nos alimentos, da sensibilidade do microrganismo em relação aos fatores intrínsecos e extrínsecos que envolvem o alimento, da porção de alimento consumido e ainda da idade, estado geral de saúde, condição física, estado nutricional, acidez gástrica e perfil genético do hospedeiro (Baptista & Venâncio, 2003).

## **1.3 Doenças de Origem Alimentar em Portugal**

As doenças de origem alimentar constituem uma das causas de mortalidade a nível mundial (EFSA, 2015; Viegas et al., 2015). Com o objetivo de precaver este tipo de doenças e identificar os produtos alimentares contaminados, assim como os principais fatores que contribuem para a essa contaminação, relacionados com o preparo e manipulação dos alimentos, anual-

mente os estados membros da União Europeia reportam à EFSA os dados da pesquisa efetuada no âmbito do esclarecimento de surtos de infeções/intoxicações/toxinfeções alimentares (Correia et al., 2013; Viegas et al., 2015).

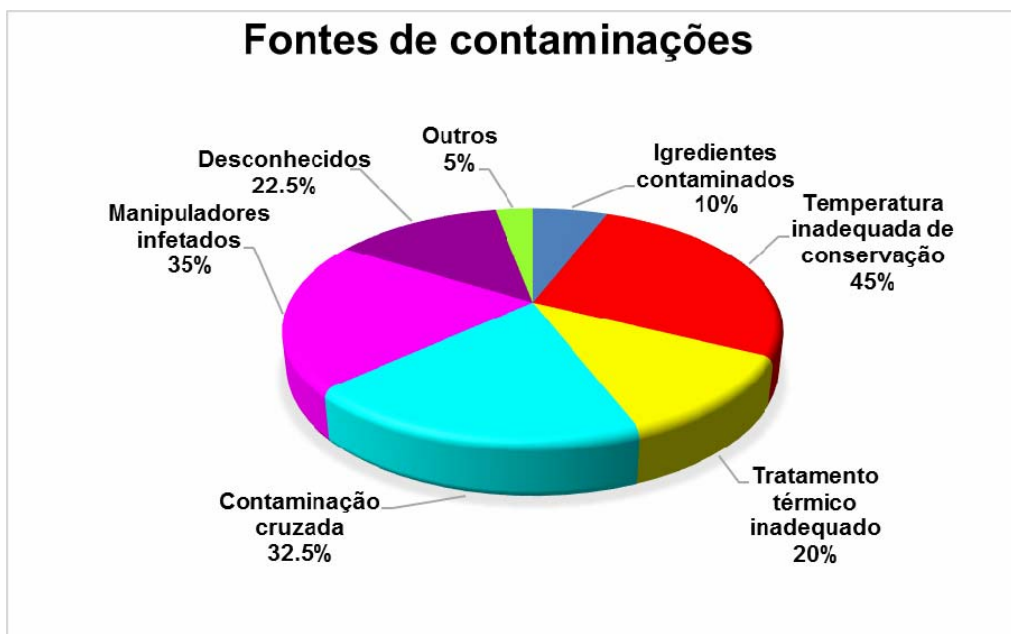
Assim, na União Europeia em 2014, foram notificados 5 251 surtos de doenças de origem alimentar, que envolveram 45 665 pessoas e que originaram 6 438 hospitalizações e 27 mortes (EFSA 2015). Os dados reportados à EFSA relativos a Portugal são estudados pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) – Laboratório de Microbiologia Alimentar (Trindade, 2014; Viegas et al., 2015).

Entre 2008 e 2014, o INSA investigou diversos surtos, tendo identificado o agente etiológico em 67 deles. Nos surtos identificados com agente causal 1 454 pessoas foram afetadas, 257 tiveram internamento hospitalar e registou-se uma morte (Tabela 1.2) (Viegas et al., 2014).

**Tabela 1.2. Surtos com agente etiológico identificado em alimentos, ocorridos em Portugal no período entre 2008 e 2014 (Viegas et al., 2014).**

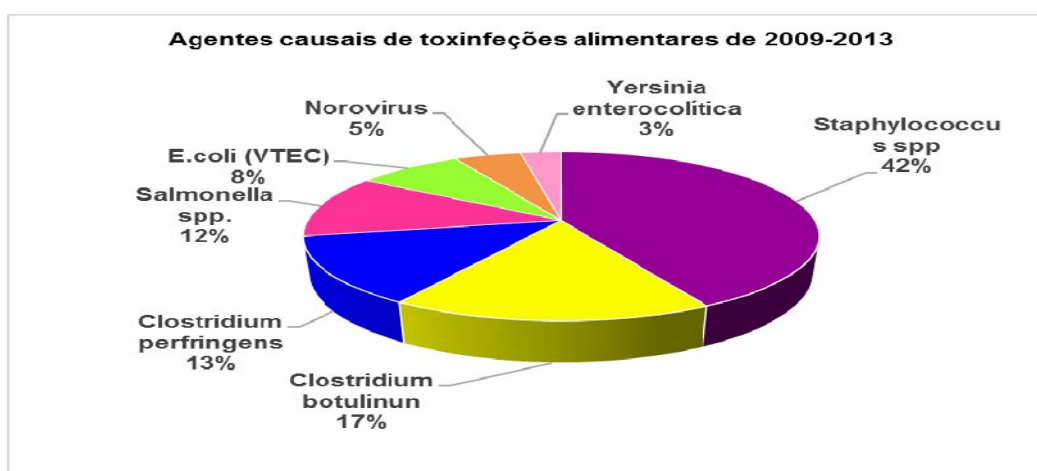
Número	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Total
Surto	14	11	4	8	7	10	13	67
Casos	139	251	56	101	135	183	589	1454
Hospitalizados	92	90	0	1	1	17	56	257
Mortes	0	1	0	0	0	0	0	1

Os géneros alimentícios mais envolvidos foram as refeições mistas (saladas frias e quentes e pratos confeccionados) e os produtos de pastelaria e bolos (Viegas et al., 2014). Os fatores que se identificaram como tendo sido os que maioritariamente contribuíram para os surtos de origem alimentar notificados em Portugal no período entre 2009-2013 foram a utilização de ingredientes contaminados em alimentos, preparação dos géneros alimentícios com tratamento térmico inconveniente, falha no controlo de temperatura durante a fase de conservação e distribuição dos alimentos, arrefecimento inadequado, manipuladores infetados e contaminação cruzada (Figura 1.1) (Viegas et al., 2015).



**Figura 1.1** Fatores contributivos das toxinfecções alimentares entre 2009-2013 (Viegas et al., 2015).

O agente etiológico mais frequente nos surtos ocorridos entre 2009 e 2013 foram as enterotoxinas estafilocócicas, seguidas do *Clostridium botulinum* (Figura 1.2) (Viegas et al., 2015).



**Figura 1.2.** Agentes causais dos surtos de doença alimentar ocorridos em Portugal entre 2009 e 2013 (Viegas et al., 2014).

Dos surtos ocorridos em Portugal no período compreendido entre 2009 e 2013, 35% foram reportados em casas particulares, 15% em restaurantes, 12,5% em cantinas, 15% em instituições residenciais e 7,5% em escolas (Viegas et al., 2015). Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/OMS, 2002), as casas privadas são os lugares com maior percentagem em casos de ocorrências de toxinfecções alimentares.

## 1.4 A Segurança alimentar

A segurança alimentar é um assunto complexo, com muitas dimensões, envolvendo tanto a saúde pública, a área científica, a política, o comércio e a confiança do consumidor. O objetivo principal é diminuir ou prevenir as doenças de origem alimentar, tornando os alimentos mais seguros (FAO/WHO, 2002).

Para garantir uma proteção eficaz aos consumidores e de modo a facilitar o comércio é indispensável garantir um nível admissível de qualidade e segurança alimentar. Portanto, por meio da implementação e monitorização de medidas de garantia de qualidade ao longo de toda cadeia alimentar é possível alcançar estas metas. É da responsabilidade de todos manter o fornecimento de alimentos seguros desde o agricultor ao consumidor, tomando todos os cuidados necessários para manter a inocuidade dos alimentos, sendo que, estes cuidados permitem, igualmente, minimizar as perdas de géneros alimentícios (Whitehead, 1998; FAO/WHO, 2002).

Para que os alimentos cheguem aos consumidores em perfeitas condições, sem constituírem um risco para a sua saúde, é essencial que os fabricantes utilizem as boas práticas agrícolas (BPA), boas práticas veterinárias (GVPs), boas práticas de fabrico (BPF) e boas práticas de higiene pessoal (BPH). Estas boas práticas quando aplicadas devidamente garantem a qualidade e a segurança alimentar em todas as fases de processamento de alimentos. A implementação de BPH envolve aplicação de medidas sanitárias apropriadas de modo a evitar a contaminação de germes e por outro via garantir as condições higiénicas ideais para o processamento de alimentos. Mas para além disso, a qualidade dos produtos alimentares também depende das características da matéria-prima, do armazenamento, da qualidade do transporte e das condições no ponto de venda. Portanto a qualidade dos géneros alimentícios, também depende de todos os intervenientes da cadeia de produção e distribuição de alimentos (EUFIC, 1998; Whitehead, 1998; Rentokil, 2016).

O sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP) constitui uma ferramenta preventiva de controlo da qualidade e segurança alimentar. Este sistema, aceite internacionalmente e documentado pelo *Codex Alimentarius*, baseia-se na identificação sistemática dos perigos específicos associados ao manuseamento durante o processo de produção, bem como no estabelecimento quer dos parâmetros a controlar, quer das medidas preventivas a adotar, para evitar a ocorrência dos diversos perigos identificados.

Para a produção diária de alimentos seguros existem uma série de pré-requisitos que providenciam um suporte essencial a um sistema de HACCP efetivo. Os pré-requisitos são definidos como passos universais ou procedimentos que controlam as condições operacionais no interior de uma indústria alimentar, permitindo a produção de alimentos seguros. Neste âmbito estão inseridas condições como as estruturas físicas das instalações, as regras de higiene, o controlo de pragas, a gestão de resíduos, a qualidade da água, a manutenção da cadeia de frio, a ges-



tão das embalagens, as condições de armazenamento, a manutenção dos equipamentos e a formação do pessoal (Regulamento (CE) nº 852/2004).

É da responsabilidade das autoridades competentes definir os modelos de segurança alimentar, realizar inspeções, bem como garantir que as exigências legais sejam executadas (FAO/WHO 2002; Foodsafety.gov 2016). De acordo com FAO/WHO, (2002) educar os consumidores e todos os intervenientes na produção e preparação dos géneros alimentícios pode ter um papel decisivo para elevar os padrões de qualidade e segurança alimentar.

## **1.5 Contaminação cruzada**

Pittwater Council (2008) define que “A contaminação cruzada é a transferência de bactérias de alimentos crus, utensílios sujos ou superfícies sujas para alimentos prontos a consumir, utensílios limpos ou superfícies limpas.” Este tipo de contaminação pode ocorrer quando os manipuladores de alimentos não higienizam devidamente as mãos e os utensílios (facas, tábuas de corte, misturadores, etc.), devido ao contato com insetos ou roedores, quando não existe uma separação entre alimentos crus e alimentos prontos para o consumo, nomeadamente durante o armazenamento em frio.

A prevenção da contaminação cruzada é um ponto-chave na produção de alimentos seguros, uma vez que este tipo de contaminação constitui um dos principais fatores responsáveis pela transmissão de doenças de origem alimentar (MDH, 2007; Webstaurantstore, 2016).

Tanto a NHS (2015) como a Webstaurantstore (2016) declaram que para se evitar a contaminação cruzada é necessário:

- Instituir um programa favorável de higiene pessoal que envolva os procedimentos relativos à lavagem correta das mãos, ao uso de luvas, tocas e aventais descartáveis, assim como à limpeza dos uniformes;
- Verificar se a equipa antes e depois de manusear os alimentos crus lava as mãos cuidadosamente e com frequência;
- Certificar que a equipa está a fazer mudança de luvas ao manusear distintos alimentos ou materiais;
- Para alimento crus e pronto para comer devem usar-se utensílios e equipamentos de cores diferentes como por exemplo: utilizar placas de corte coloridas e utensílios das mesmas cores, para ajudar a manter a separação dos equipamentos e utensílios;
- Lavar e desinfetar os utensílios, equipamentos e áreas de trabalho após a realização de cada tarefa;

- Suspender temporariamente os funcionários que apresentarem algum problema de saúde de maneira a evitar a contaminação dos alimentos e a propagação dos germes.
- Armazenar separadamente os alimentos crus e os prontos a comer.

## 1.6 Fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam o crescimento microbiano

O crescimento microbiano num dado alimento é afetado por um determinado número de fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos estão relacionados com o próprio alimento ou seja ligados a atividade da água ( $a_w$ ), acidez do alimento (pH), potencial de oxidação-redução (Eh), composição química, presença de potenciais substâncias antimicrobianas naturais e a estrutura biológica do alimento (Matos, 2014). Já os fatores extrínsecos relacionam-se com as condições de armazenamento, nomeadamente, com a temperatura, humidade relativa e atmosfera envolvente, assim como do grau de manipulação/processamento do alimento.

### 1.6.1 Atividade da água ( $a_w$ )

A atividade da água representa a quantidade de água livre existente num alimento e é um fator indispensável para os microrganismos, uma vez que a água é indispensável para a sua sobrevivência, reprodução e metabolismo. Assim, a hipótese das bactérias patogénicas se desenvolverem ou produzirem toxinas é determinada pelos valores da atividade de água, que variam entre 0 e 1. Os diversos microrganismos apresentam valores máximos, mínimos e valores ótimos de  $a_w$  para o seu desenvolvimento, embora estes valores possam também ser influenciados por outras características dos alimentos (Baptista & Venâncio, 2003; Tonello, 2013; Luzzi, 2014). Geralmente as bactérias requerem maiores valores de  $a_w$  para o seu desenvolvimento em relação aos fungos (Tabela 1.3). Normalmente os fungos desenvolvem-se em géneros alimentícios com  $a_w$  acima de 0,70 mas há alguns casos específicos que são capazes de crescer em alimentos com menos água livre. Por exemplo, a levedura *Zygosaccharomyces rouxii*, na presença da frutose pode se desenvolver em alimentos com uma  $a_w$  de 0,62 (Tabela 1.3) (Jay et al., 2005).

Nos alimentos com  $a_w$  inferior a 0,60 os fungos não conseguem crescer nem tão pouco germinar, mas podem manter a sua viabilidade, podendo restituir o seu desenvolvimento e o seu metabolismo assim que atividade da água se elevar. De forma a controlar o crescimento microbiano em produtos alimentares a  $a_w$  pode ser reduzida por meio da adição de solutos como sal ou açúcar, ou através da utilização de processos de secagem e congelamento (Baptista & Venâncio, 2003; Tonello, 2013; Luzzi, 2014).

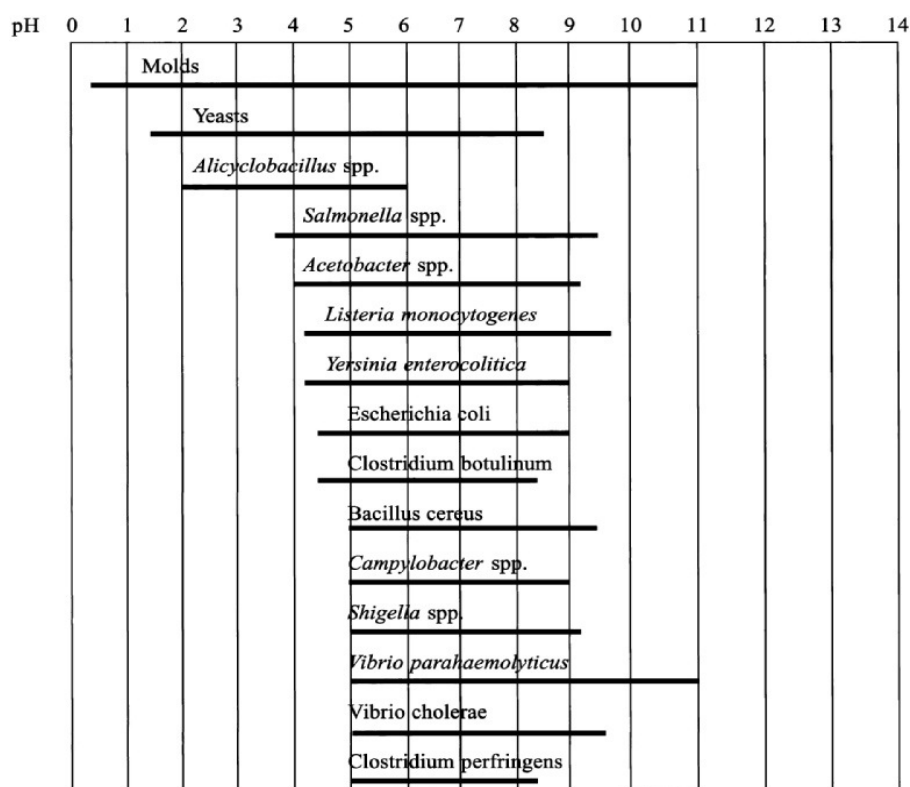
**Tabela 1.3. Valores mínimos de atividade de água para o crescimento de microrganismos patogênicos em alimentos (Jay et al., 2005).**

<b>Microrganismo</b>	<b>Mínimo</b>
<i>Acinetobacter spp.</i>	0,96
<i>Aspergillus conicus</i>	0,70
<i>Bacillus subtilis</i>	0,95
<i>Clostridium botulinum</i> tipo A e B	0,94
<i>Clostridium botulinum</i> tipo E	0,97
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,95
<i>Escherichia coli</i> entero-hemorrágica	0,96
<i>Penicillium patulum</i>	0,81
<i>Pseudomonas spp.</i>	0,97
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0,94
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0,62

### 1.6.2 Acidez do alimento (pH)

O pH é uma escala para a medição do potencial de hidrogénio que indica acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma solução. Tanto o desenvolvimento dos microrganismos como a sua taxa de sobrevivência nos alimentos durante a fase do armazenamento ou conservação são afetados pelo pH dos alimentos. Tendo em conta que cada microrganismo tem uma gama determinada de pH onde consegue desenvolver-se, por meio dos valores de pH dos géneros alimentícios é possível saber quais os microrganismos com maior probabilidade de se encontrarem presentes (Matos, 2014).

A Figura 1.3 mostra que a generalidade dos microrganismos cresce melhor a valores de pH de aproximadamente 7, existindo, no entanto, alguns capazes de sobreviverem em valores de pH abaixo de 2 e acima de 10 (Jay et al., 2005; Matos, 2014).



**Figura 1.3** Valores aproximados de pH para o crescimento de alguns microrganismos nos alimentos (Jay et al., 2005).

### 1.6.3 Composição química do alimento

Os microrganismos carecem de um conjunto de nutrientes indispensáveis para o seu desenvolvimento e para a realização das suas funções metabólicas, sendo que o tipo e a quantidade de cada nutriente diferem de microrganismo para microrganismo. Para que os microrganismos possam desenvolver-se satisfatoriamente é primordial que o substrato possua: água, sais minerais, glúcidos, vitaminas, proteínas e lípidos, claro que esses elementos determinam as características específicas de cada alimento, definindo as espécies de microrganismos aptas para o seu crescimento (Tonello, 2013; Luzzi, 2014).

### 1.6.4 Potencial de oxidação-redução (Eh)

Os processos de óxido e redução estão ligados com a troca de eletrões entre as substâncias químicas. O potencial de oxido-redução (Eh) pode ser definido como a capacidade que uma dada matriz tem para ganhar ou perder eletrões. Em concordância com a composição do alimento e com atmosfera que o circunda, o potencial redox pode variar de oxidante a redutor. A oxidação é indicada pela perda de eletrões ao passo que a redução é apontada pelo ganho de eletrões. O potencial de Eh é avaliado por meio de elétrodos ou corantes indicados e a sua

unidade é expressa por milivolt. Este fator intrínseco é afetado pelo pH do substrato e a sua medição é geralmente realizado a pH 7,0 (Baptista & Venâncio, 2003; Tonello, 2013; Luzzi, 2014).

Os microrganismos baseiam o seu crescimento numa relação com o potencial redox, sendo que os aeróbios, como, por exemplo, a maioria dos fungos filamentosos ou as bactérias do género *Pseudomonas* crescem com valores de Eh entre +500 e +300 mV, os anaeróbios, como o *Clostridium botulinum*, entre +100 e -250 mV, os anaeróbios facultativos entre +300 e -100 mV e os microaerófilos com valores intermédios correspondendo a condições em que haja uma diminuição ligeira do Eh (Baptista & Venâncio, 2003; Luzzi, 2014; Matos, 2014).

### **1.6.5 Estrutura biológica do alimento**

Determinados alimentos tanto de origem animal como de origem vegetal apresentam estruturas biológicas que operam como barreiras físicas, capazes de impedir a invasão de microrganismos ou seu crescimento. Como exemplo de barreira física é possível enumerar a cutícula do ovo, as cascas dos frutos e dos vegetais, as conchas das nozes e as conchas dos mariscos. A conservação das estruturas biológicas dos alimentos pode ser essencial para prevenir a entrada e, posteriormente, o desenvolvimento microbiano. Alguns danos causados nas cascas de alguns frutos e vegetais durante as fases de colheita, transporte, armazenamento, podem possibilitar a penetração de microrganismos e auxiliar o acesso aos nutrientes indispensáveis para o seu desenvolvimento (Baptista & Venâncio, 2003; Matos, 2014).

### **1.6.6 Substâncias antimicrobianas naturais presentes no alimento**

Alguns alimentos de origem animal ou vegetal podem possuir naturalmente substâncias antimicrobianas que dificultam a ocorrência de infeções microbianas. Por exemplo, a lisozima, enzima existente na clara do ovo, é capaz de inibir eficazmente o crescimento de bactérias Gram-positivas; as ameixas, os morangos e as amoras contêm ácido benzóico com ação bactericida e fungicida. As substâncias antimicrobianas, apesar de contribuem positivamente para impedir o crescimento de microrganismos, podem não se encontrar naturalmente em níveis suficientemente elevados para serem totalmente eficientes, precisando de ser combinadas com outros fatores como o pH ou atividade da água de forma a garantir a segurança do alimento (Baptista & Venâncio, 2003; Matos, 2014).

### 1.6.7 Temperatura

Com base nas exigências de temperatura para o seu desenvolvimento os microrganismos podem ser divididos em grupos. Assim, os organismos que crescem bem ou abaixo de 7 °C e têm a sua temperatura ótima entre 20 °C e 30 °C são mencionados como psicrotróficos. Os microrganismos que crescem bem entre os 20 °C e 45 °C e têm o seu ideal entre 30 °C e os 40 °C são referidos como mesófilos e aqueles que se desenvolvem bem acima de 45 °C com temperatura ideal entre 55 °C e 65 °C são referidos como termófilos (Jay et al., 2005).

A maioria de microrganismos patogénicos tem o seu ótimo de crescimento entre os 30 °C e os 45 °C (Tabela 1.4). É de salientar que quanto mais próximo da temperatura ótima de desenvolvimento se encontrar o alimento mais rápido é o crescimento microbiano (Baptista & Venâncio, 2003; Matos, 2014).

Certos microrganismos podem manter-se viáveis por longos prazos em alimentos congelados. Os efeitos da congelação e da refrigeração dependem do tipo de microrganismo, do tempo e da temperatura de conservação em que o alimento está submetido (Baptista & Venâncio, 2003).

**Tabela 1.4. Temperatura mínima, ótima e máxima, para alguns microrganismos patogénicos em alimentos (Matos, 2014).**

Microrganismos	Mínimo (°C)	Ótima (°C)	Máxima (°C)
<i>Salmonella spp.</i>	5	35 a 37	45 a 47
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	35 a 40	48
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	30 a 37	45
<i>Escherichia coli</i>	7	35 a 40	46

### 1.6.8 Humidade relativa e Atmosfera Gasosa

A humidade relativa afeta diretamente a atividade de água dos produtos alimentares. Os géneros alimentícios com baixa atividade de água e acondicionados em ambiente com humidade relativa alta tendem a absorver a humidade do meio que os circunda, podendo, esta absorção causar modificações no próprio alimento, diminuindo a qualidade do produto e proporcionar o crescimento microbiano (Luzzi, 2014; Matos, 2014).

A atmosfera gasosa também exerce uma grande influência sobre a multiplicação dos microrganismos. É importante evidenciar que uma atmosfera mais ou menos rica em gases como azoto, oxigénio ou dióxido de carbono pode regular o crescimento microbiano. A oxidação produzida

pelo oxigénio e pelo ozono é muito tóxica para as bactérias anaeróbias, podendo ser também fatal para os microrganismos aeróbios, dependendo sobretudo da sua concentração. No entanto o dióxido de carbono é eficiente para os microrganismos aeróbios podendo, em elevadas concentrações, impossibilitar o desenvolvimento de outros microrganismos (Baptista & Venâncio, 2003).

Por meio de processos tecnológicos convenientes é possível modificar a composição gasosa do meio em que os produtos alimentares se encontram, aumentando assim o seu tempo de vida útil (Luzzi, 2014). Estas tecnologias incluem a embalagem em atmosfera modificada; o armazenamento em atmosfera controlada e embalagem em atmosfera controlada (Baptista & Venâncio, 2003; Luzzi, 2014).

## **1.7 Produtos Hortofrutícolas minimamente processados**

A associação entre o consumo de produtos vegetais e a diminuição do risco de desenvolvimento de enfermidades crónicas tem contribuído para a crescente procura de vegetais e, por questões de conveniência, para a crescente procura de vegetais minimamente processados.

As hortaliças e as frutas minimamente processadas são em geral produtos que apesar de apresentarem alterações físicas, mantêm o seu estado fresco e assim as suas características nutricionais e sensoriais, não necessitando, na maioria dos casos, de preparação posterior para o consumo. O impacto social e económico deste tipo de produtos é considerável, pois que contribuem para a diversificação das indústrias, proporcionam alternativas de comercialização, melhoram o manuseio dos resíduos, facilitam o transporte e a diminuição de perda pós – colheita. Além disso o processamento mínimo dos hortofrutícolas possibilita maior aproveitamento da produção, agrega valor ao produto e todavia é adequado às pequenas empresas.

O elevado manuseamento que estes produtos alimentícios sofrem e o aumento do seu consumo fez aumentar o cuidado com o risco potencial para a saúde pública que eles representam, visto que a manipulação excessiva destes produtos pode influenciar a sua segurança alimentar e a sua vida útil (Santos et al., 2010; Coniglio et al., 2016).

Para além dos problemas de contaminação relacionados com falhas nos processos de lavagem e sanitização dos hortofrutícolas, o processamento mínimo pode promover a contaminação microbiana (agentes deteriorantes e patogénicos), devido à elevada manipulação e ao aumento das lesões nos tecidos. As hortaliças folhosas, especialmente a alface, têm sido reconhecidas como veículos de agentes patogénicos como *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Sigella* (Santos et al., 2010). Os organismos específicos que têm sido encontrados em produtos minimamente processados são especialmente os bolores, as leveduras, bactérias do grupo dos coliformes e organismos pectinolíticos (Silva et al., 2011).

A presença de microrganismo nesses géneros alimentícios pode ser atribuída ao solo de cultivo e à água de irrigação pois que muitos patogénicos são encontrados na água e no solo como flora normal. No entanto a água pode ser uma fonte de transmissão dos microrganismos para os produtos hortícolas não só durante a sua produção mas também durante o seu processamento, nomeadamente nas etapas de lavagem, corte e imersão na água. Logo há necessidade de realçar a implementação de normas rigorosas de controlo de higiene para os produtos minimamente processados (Cerna-Cortes et al., 2015). O uso de atmosfera modificada, a utilização de sanitizantes e o controlo eficaz da temperatura de armazenamento, minimizam consideravelmente o desenvolvimento microbiano (Silva et al., 2011).

### 1.7.1 Fluxograma de processamento mínimo dos hortofrutícolas

A preparação de produtos minimamente processados inclui as fases de receção, seleção da matéria-prima, lavagem, descascamento, corte, sanitização, enxaguamento, centrifugação ou drenagem, seleção final, acondicionamento e armazenamento, com finalidade de oferecer aos consumidores conveniência e qualidade nutricional (Figura 1.4).

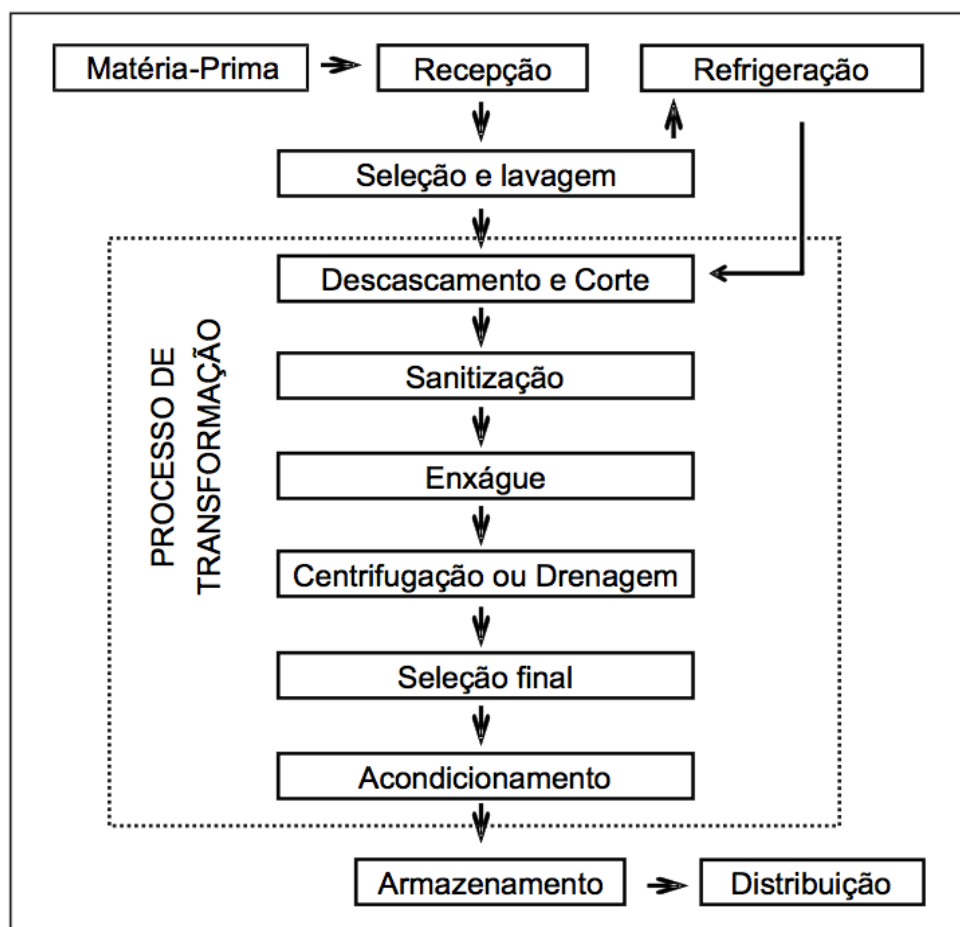


Figura 1.4. Etapas gerais do processamento mínimo de produtos hortofrutícolas (Silva et al., 2011).



Sendo a recepção a primeira etapa do fluxograma, ela fundamenta-se nos procedimentos de quantificar, selecionar, qualificar, caracterizar e dar destino à matéria-prima que se dirige à unidade de transformação. A qualificação e a classificação são essenciais nesta fase pois que refletem o cuidado com a homogeneidade e a qualidade da matéria-prima. Cada produto deve ser classificado segundo o seu tamanho, forma e peso de modo a facilitar o manuseio durante o processamento mínimo. A qualidade compreende as características organoléticas e um atributo diminuto pode tornar o produto inadequado para o processamento (Silva et al., 2011).

A seleção das hortaliças consiste na rejeição das matérias-primas inconvenientes para o consumo, como, por exemplo, vegetais que não se apresentem no grau de maturação desejado ou porções não processáveis tais como talos, raízes, folhas velhas e inflorescências danificadas. Normalmente esta operação é executada de forma manual (Vasconcelos, 2005; Silva et al., 2011).

A diminuição da temperatura ambiente após a colheita é denominada por pré-arrefecimento. O aumento de vida útil do produto está relacionado com a rapidez com que o produto é arrefecido. Esta operação tem como finalidade evitar a perda de turgescência dos tecidos das folhas e minimizar perdas vitamínicas, como, por exemplo, as perdas de vitamina C. De acordo com o método utilizado, o arrefecimento pode ser realizado em menos de 30 minutos ou mais de um dia. Os métodos mais usados são geralmente aplicação de água gelada e a refrigeração em câmaras. Por exemplo, para a alface, o arrefecimento rápido ocorre juntamente com a lavagem, mediante a submersão por 15 minutos em água arrefecida a 5 °C. A lavagem tem como objetivo principal retirar certos resíduos que possam encontrar-se aderentes às verduras ou aos legumes (Silva et al., 2011; Vasconcelos, 2005).

O descascamento e corte visam principalmente a preparação da matéria-prima para suas diversas utilizações. Em certos produtos tais como tubérculos, frutas e raízes, o corte é seguido pela retirada das cascas. O descascamento é efetuado com apoio de descascadores manuais ou por meio de equipamentos indústrias previamente higienizados. Atualmente, técnicas como a alteração da pressão, a abrasão e utilização de químicos (cáusticos) são as mais utilizadas. As hortaliças podem sofrer diversos tipos de cortes originando diferentes formas de apresentação. Por exemplo, as alfaces podem ser comercializadas em fatias ou em folhas inteiras e as raízes, como, por exemplo, as cenouras podem ser raladas ou preparadas em rodela, fatias, cubos ou em palitos (Silva et al., 2011; Vasconcelos, 2005).

A redução de tamanho é estabelecida pelo tipo de aspeto pretendido para o produto final, mas todavia a redução de dimensões consiste numa operação delicada pois que nesta etapa os produtos hortofrutícolas podem sofrer danos elevados, o que coopera para o aumento da atividade enzimática e microbiana. Além disso as operações como descascar, cortar ou fatiar e descaroçar reduzem o tempo de vida útil do produto, afetam o seu sabor, cor e textura e tam-

bém promovem a libertação de nutrientes que estimulam o crescimento microbiano (Vasconcelos, 2005).

Seguidamente ao corte, o material processado deve passar por um processo de sanitização. A higienização abrange as fases de lavagem e de sanitização de todos produtos que estão sujeitos ao processamento mínimo. Para as hortaliças a lavagem é efetuada em duas etapas: primeiramente lavagem com água corrente e logo após, imersão em solução com detergente indicado para os alimentos. Mas é importante salientar que a concentração de detergente, bem como o tempo de contacto, varia em conformidade com a hortaliça e com a recomendação do fabricante. Após a lavagem as hortaliças são enxaguadas para a remoção total do detergente. Os sanitizantes recomendáveis para os produtos hortofrutícolas minimamente processados são dióxido de cloro, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogénio, ácido peracético e ozono (Silva et al., 2011; Vasconcelos, 2005).

Após a sanitização e enxaguamento os produtos são drenados e centrifugados para retirar o excesso de água proveniente das fases anteriores, assim como resíduos de exsudado celular resultante do corte que promovem o crescimento de microrganismos patogénicos e deterioradores (Vasconcelos, 2005; Silva et al., 2011).

Depois de secos os produtos podem passar novamente por um processo de seleção, para retirar as folhas com defeitos e impurezas decorrentes do processamento, sendo de seguida pesados e acondicionados, isoladamente ou em misturas com proporções pré-estabelecidas, em embalagens específicas, com atmosfera modificada capaz de oferecer ao produto os requisitos indispensáveis para a sua conservação por um período suficiente. Os produtos embalados e devidamente etiquetados são armazenados em câmaras a cerca de 5 °C e humidade relativa entre 80% e 90% até a sua distribuição (Vasconcelos, 2005; Silva et al., 2011).

### **1.7.2 Controlo de perigos Biológicos em produtos minimamente processados**

Os métodos de conservação dos alimentos têm como finalidade retardar ou impedir as alterações dos géneros alimentícios, conservando as suas qualidades organoléticas e nutricionais (Ferreira, 2013).

Apesar do estado fresco e do valor nutritivo dos vegetais minimamente processados se assemelhar ao produto natural, inúmeras reações fisiológicas e bioquímicas tornam-se mais ativas nos tecidos cortados, sobretudo nos tecidos adjacentes ao corte. A ação das enzimas do próprio alimento, a oxidação não-enzimática e o crescimento microbiano são responsáveis por modificações da qualidade sensorial (coloração, sabor, aroma e textura) e nutricional dos pro-

dutores alimentares e também pela diminuição do tempo de vida útil do alimento e da sua segurança alimentar (Lima et al., 2003; Silva et al., 2011).

As técnicas para a conservação dos produtos minimamente processados envolvem a refrigeração e a embalagem com atmosfera modificada que minimizam simultaneamente a taxa de respiração e a senescência; o controlo da humidade que reduz a perda de água pelos alimentos; aditivos químicos que controlam as modificações fisiológicas e limitam a carga microbiana e ainda a irradiação ionizante como técnica auxiliar na redução da população microbiana de produtos hortofrutícolas (Lima et al., 2003).

### **1.7.3 Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de vegetais prontos a consumir**

A microflora presente nos produtos alimentícios pode ser constituída por microrganismos patogénicos e não patogénicos. Os agentes patogénicos são aqueles que podem não provocar alterações nos alimentos, mas são capazes de originar doenças infecciosas nos consumidores sempre que estejam em circunstâncias favoráveis sendo, assim, os organismos responsáveis pelas doenças transmitidas pelos alimentos.

A contaminação microbiológica em produtos alimentares prontos a ser consumidos, como é o caso dos vegetais minimamente processados, é particularmente preocupante uma vez que estes alimentos já não vão sofrer nenhuma etapa de processamento que permita reduzir essa contaminação a um nível aceitável. Por esse motivo o controlo da contaminação microbiológica desse tipo de alimentos é crítica para assegurar a segurança dos mesmos.

O Regulamento no.1441/2007, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, indica para os vegetais minimamente processados a pesquisa de *Escherichia coli* como indicador de higiene e a pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* como indicadores de segurança, não incluindo a pesquisa de mais nenhum microrganismo ou grupo de microrganismos. Nesse sentido, em Portugal, de modo a preencher essa lacuna existente nos regulamentos, no que diz respeito a alimentos prontos a comer, o INSA instituiu e publicou uma tabela de Valores Guia. Estes valores não têm qualquer estatuto legal, mas constituem linhas de orientação para avaliação da qualidade microbiológica

Em relação às saladas e produtos vegetais crus e prontos a consumir o INSA estabeleceu valores guia em relação microrganismos aeróbios totais a 30 °C, leveduras, bolores, coliformes totais, *E. coli*, *Listeria* spp., anaeróbios sulfitos redutores, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Vibrio parahaemolyticus* e *Yersinia enterocolitica* (Santos et al., 2005).

A pesquisa deste mais amplo conjunto de microrganismos permite avaliar de uma forma mais exaustiva as condições de higiene e de segurança dos alimentos prontos a consumir. Nos pontos que se seguem detalham-se as características e o interesse da pesquisa de alguns destes microrganismos ou grupos de microrganismos.

#### **1.7.3.1 Microrganismos totais a 30 °C**

A contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C inclui a contagem de espécies de bactérias e fungos que crescem em temperaturas moderadas. Assim, os microrganismos totais são definidos como número de microrganismos que existe num determinado produto alimentar em condições ótimas de culturas e os mesmos não se diferenciam entre tipo (levedura, bolor ou bactéria).

Esta contagem constitui um indicador geral de qualidade alimentar, pois que indica a verificação adequada de temperatura e saneamento durante a fase de processamento, armazenamento e distribuição, e além disso revela fontes de contaminação durante o processamento. Embora a enumeração dos microrganismos totais a 30°C constitua um fraco indicador de segurança alimentar, uma vez que não se correlaciona diretamente com a presença de toxinas ou de agentes patogénicos (MBL 2014; FAO 2016), a presença de um grande número destes microrganismos pode ser indicador de más práticas de higiene e, assim, de uma maior probabilidade de existência de microrganismos causadores de doenças.

#### **1.7.3.2 Leveduras**

As leveduras são fungos unicelulares, capazes de se desenvolver em condições anaeróbias e aeróbias. Estes organismos tendem a desenvolver-se no interior da matriz do alimento e estão bastante envolvidos nos processos de deterioração. Diversos alimentos podem ser deteriorados por leveduras, como, por exemplo, frutas frescas, legumes, cereais, nozes, grãos, massas, carnes, produtos lácteos, farinha, compotas, conservas, bebidas alcoólicas, refrigerantes, produtos de pastelaria, queijos e carnes processadas (Merieux nutrisciences, 2014).

#### **1.7.3.3 Bolores**

Os bolores são fungos multicelulares, aeróbios, que crescem sob a forma de filamentos denominados de hifas, que se desenvolvem na superfície de alimentos e bebidas, ao contrário das leveduras e das bactérias, que tendem a crescer dentro de matriz de alimento. Podem ser vistos em diversos formatos e em várias cores como laranja, preto, verde, rosa ou roxo. Vulgarmente os bolores estão localizados em áreas húmidas, escuras ou cheias de vapor. Alguns bolores são fundamentais na produção de alimentos e bebidas nomeadamente, na produção de queijo e de molho de soja, sendo igualmente usados na produção de antibióticos, como, por exemplo, a penicilina. Porém os bolores são uma preocupação no sector de produção de alimentos pois que a contaminação dos géneros alimentícios com estes organismos tem levado à perda de milhares de toneladas de alimentos. Sob certas condições, determinados bolores,

nomeadamente algumas espécies dos géneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* podem produzir micotoxinas (aflatoxinas, fumonisinas e vomitoxinas) que representam riscos elevados para a saúde humana e animal, uma vez que podem ocasionar efeitos adversos para a saúde (MN 2014; Diffen 2016).

Os bolores estão amplamente distribuídos no ambiente, sendo difíceis de eliminar de matérias-primas recém-colhidas. Para restringir os níveis de fungos durante a fase de crescimento, colheita e transporte de matérias-primas, os produtores devem seguir as boas práticas de fabrico (BPF) e efetuar uma série de medidas como (MN, 2014):

- Controle da humidade nos grãos;
- Lavagem completa da matéria-prima;
- Apressar as transferências para processadores;
- Descartar matérias comprometidas (feridas, estragadas ou as que apresentam sinais de apodrecimento);
- Assegurar práticas de higienização rigorosas nas áreas de manipulação dos alimentos;
- Realizar análises de rotina do ambiente da fábrica para averiguar se o programa de desinfecção e limpeza está a cumprir com seus objetivos.

#### **1.7.3.4 Coliformes totais**

Bactérias coliformes são um grupo de bactérias gram-negativas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, não produtoras de esporos, pertencentes à família das *Enterobacteriaceae* e que apresentam forma de bastonete. Estes microrganismos estão sempre presentes no trato digestivo dos animais vertebrados, inclusive no homem, e são encontrados normalmente nas fezes, podendo, igualmente, alguns desses organismos ser encontrados no solo, na água e em plantas (Cardoso et al., 2001; MDH 2016; MerckMillipore 2016b).

Segundo New York State Department of Health (2011), dentro das bactérias coliformes pode distinguir-se um sub-grupo, o dos coliformes fecais, que se encontram presentes no trato intestinal e nas fezes de animais de sangue quente, incluindo o homem. Assim, os coliformes totais incluem todos os coliformes, tanto os que são encontrados no solo, na água e nas plantas como os que existem no intestino dos animais de sangue quente. Os coliformes fecais são indicativos específicos de contaminação fecal enquanto os coliformes totais avaliam condições higiénicas.

Por se resultarem da contaminação fecal, os coliformes fecais podem ser utilizados como indicadores deste tipo de contaminação, indicando a presença potencial de bactérias causadoras de doenças em água ou em alimentos, uma vez que muitas destas bactérias podem ser transmitidas por esta via (New York State Department of Health, 2011; BD 2016).

### 1.7.3.5 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* (*E.coli*) é um coliforme fecal. Assim, é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa que apresenta forma de bastonete. A *E. coli* é um microrganismo predominante do intestino de seres humanos e de outros mamíferos, pelo que a sua presença em água e em alimentos aponta logo para uma contaminação fecal e possível presença de patogénicos entéricos. A maioria das estirpes de *E. coli* é inofensiva e proporciona benefícios para a saúde do hospedeiro, podendo prevenir a colonização do intestino por microrganismos prejudiciais (Viegas, 2009; Lampel et al., 2012; MerckMillipore 2016b). No entanto, algumas estirpes desta espécie podem ocasionar intoxicações alimentares graves em humanos. As estirpes patogénicas de *E. coli* podem classificar-se como (Viegas, 2009):

- ***E. coli* enterotoxigénica (ETEC):** Principais causadoras de diarreia em crianças em países menos desenvolvidos e da diarreia do viajante de países com boas condições sanitárias para países com condições de higiene precárias. As doenças provocadas por estas estirpes são usualmente diarreia aquosa com cólicas abdominais, mal-estar, vómitos e febre.
- ***E. coli* enteropatogénica (EPEC):** Causa diarreia em crianças até aos três anos de idade nos países em desenvolvimento. Em geral estas estirpes provocam diarreia aquosa acompanhada de febre e vómitos.
- ***E. coli* enterohemorrágica (EHEC):** É a responsável por doenças mais críticas em humanos. Estirpes produtoras de verotoxina, sendo que as infeções em seres humanos estão mais frequentemente associados ao serotipo O157:H7. Geralmente os casos humanos são esporádicos e os sintomas têm a duração de um a sete dias e, normalmente, consistem em diarreia aquosa ou hemorrágica e, casualmente, vómitos. Todavia estas infeções podem resultar num quadro de síndrome urémico hemolítica (HUS) que é qualificado por insuficiência renal aguda, anemia e trombocitopenia, sendo a infeção com o serotipo O157:H7 considerada a maior causa de insuficiência renal em crianças (Viegas, 2009).
- ***E. coli* enteroinvasiva (EIEC):** Infeta a mucosa do cólon, reproduz-se no interior dos enterócitos propagando-se para as células adjacentes e levando, posteriormente, à destruição das células infetadas. Os sintomas caracterizam-se por diarreia inicialmente aguda e aquosa que progride para fezes sanguinolentas e mucóides, com cólicas abdominais e febre.
- ***E. coli* enteroagregativa (EAEC):** A sua terminologia é devido ao seu padrão típico de ligação às células tecidulares formando agregados de grande dimensão, podendo causar tanto diarreia aguda como persistente.

As estirpes patogénicas de *E. coli* são usualmente transmitidas por meio de alimentos ou água contaminada com material fecal. Os alimentos que têm sido frequentemente implicados em

surtos são principalmente leite não pasteurizado, sumos de frutas, carnes (carne bovina, carne ovina e carnes de caça), alface, queijo e hambúrguer cru ou mal cozido (Viegas, 2009).

### 1.7.3.6 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria anaeróbia facultativa, gram-positiva, que se movimenta por meio de flagelos e apresenta forma de bastonete. Esta bactéria encontra-se abundantemente na natureza, e pode ser localizada no solo, em ambientes húmidos, em vegetação em decomposição, em animais domésticos e em animais selvagens infetados. Este microrganismo é um dos principais responsáveis pela mortalidade causada por infeções alimentares, principalmente em população de risco em países industrializados. De acordo com um relatório do Centro de Controlo e Prevenção de doenças (CDC), nos EUA, a taxa de mortalidade devido a meningites provocadas pela infeção com *Listeria* pode chegar aos 70% e a taxa resultante das infeções neonatais pode ser superior a 80%. Em relação a muitos outros agentes patogénicos a *L. monocytogenes* é uma bactéria que consegue sobreviver e crescer a temperaturas abaixo de 1 °C, sendo tolerante ao sal. Estas duas características tornam este organismo um problema particular para as indústrias alimentares. O facto desta bactéria se reproduzir a temperaturas baixas (2 - 4 °C) facilita a sua ocorrência em géneros alimentícios prontos a comer com tempo de prateleira prolongado (Viegas, 2009; Lampel et al., 2012).

Para além da *L. monocytogenes*, das restantes cinco espécies de *Listeria* (*L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri*), a espécie *L. ivanovii* é considerada patogénica, particularmente em ruminantes (Lampel et al., 2012).

Geralmente a *L. monocytogenes* pode ocasionar dois tipos de doença. O primeiro tipo de doença tem a ver com doenças gastrointestinais não-invasivas que podem originar sintomas como febre, diarreia, náusea, dores abdominais e vómitos. O segundo tipo de doença pode ocasionar doenças invasivas como meningite pois que a infeção neste caso se espalha através da corrente sanguínea para o sistema nervoso, afetando o cérebro. As crianças dos 0 aos 3 anos de idade, os idosos, as mulheres grávidas e as pessoas com sistemas imunológicos comprometidos (por exemplos pessoas portadoras de SIDA, pessoas com problema de cancro ou diabetes) também são as mais vulneráveis a infeção por *Listeria* (Viegas, 2009).

Muitos produtos alimentares têm sido associados a surtos com esta bactéria especialmente queijos (sobretudo queijos macios), sorvetes, leite cru, leite inadequadamente pasteurizado, leite com chocolate, carnes, peixe cru, salsichas de carne crua, peixe fumado, cachorros quentes, frutos do mar e vegetais crus (Lampel et al., 2012).

### 1.7.3.7 Bactérias anaeróbias sulfito-redutoras

Dentro deste grupo de bactérias encontram-se as espécies do género *Clostridium*. Estas bactérias são gram-positivas, anaeróbias obrigatórias e formadoras de endósporos. Esses organismos estão distribuídos no ambiente naturalmente podendo ser localizados no solo, em sedimentos marinhos, em vegetação em decomposição e também no trato intestinal de seres humanos e de animais de sangue quente. A maioria desses organismos não é patogénica, porém algumas espécies produzem toxinas com elevada toxicidade para o Homem. As espécies patogénicas incluem o *C. tetani* que causa infeções de tétano; *C. perfringens* que é responsável por intoxicações alimentares e *C. botulinum* que provoca botulismo (Kouassi et al., 2011; MerckMillipore 2016a).

Os esporos das bactérias anaeróbias sulfito-redutoras encontram-se amplamente distribuídos também no ambiente, podendo estar presentes no solo, em águas residuais e em material fecal humana ou animal. Os esporos são mais resistentes ao calor e a outros fatores de *stress* do que as formas vegetativas, podendo sobreviver à cozedura normal ou às condições de processamento de géneros alimentícios como carnes assadas, presunto e carne enlatada (Kouassi et al., 2011; Manafi & Siegrist, 2011; MerckMillipore, 2016a).

O *Clostridium perfringens* é encontrado em alimentos enlatados mal esterilizados (germinação de endosporos) e em água superficiais. Este agente patogénico produz enterotoxinas que são responsáveis por intoxicações alimentares podendo estar envolvido em infeções cirúrgicas que conduzem a gangrena no homem e em situações de disenteria em ovelhas, cordeiros e bezerros recém-nascidos (Angelotti et al., 1962; Manafi & Siegrist, 2011). Muitos surtos estão associados ao consumo de carne vermelha e de produtos avícolas. Os sintomas resultantes da ingestão do *C. perfringens* incluem gastroenterite, especialmente diarreia e dores abdominais agudas (Kouassi et al., 2011). O *Clostridium botulinum* constitui outra preocupação para a indústria alimentar, uma vez que produz uma toxina (toxina botulínica) que perturba a função neurológica e pode provocar a morte.

### 1.7.3.8 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* são bactérias gram-positivas, não móveis, de pequena dimensão que apresentam forma esférica e produzem coagulase. Esta bactéria é um dos mais resistentes agentes patogénicos, não produz endósporos mas pode sobreviver durante longos períodos em estado seco. Em geral os *Staphylococcus aureus* encontram-se muito disseminados, sendo, por isso, muito difícil a sua completa eliminação do ambiente (Lampel et al., 2012). Com efeito, estes agentes patogénicos podem ser localizados no ar, no solo, na água, no esgoto, objetos, equipamentos de alimentos e em superfícies ambientais, além disso esses organismos podem viver no homem e no animal, pois que os *Staphylococcus* estão presentes na garganta, nas fossas nasais, na pele e no cabelo de 50% ou mais de pessoas saudáveis. A ocorrência



deste agente patogénico é ainda maior entre aqueles que se relacionam com doentes e ambientes hospitalares (Viegas, 2009).

Estas bactérias podem contaminar os alimentos podendo originar intoxicação alimentar estafilocócica (enterotoxinas), uma vez que a destruição das células viáveis pelo tratamento térmico (calor) não destrói a atividade biológica da enterotoxina produzida. Estas toxinas podem provocar vômitos, náuseas, cólicas abdominais, diarreia, dores de estômago, dor de cabeça, desidratação corporal, alterações temporárias da pressão arterial, câibras musculares e pneumonia (Viegas, 2009).

Geralmente os surtos estão associados aos alimentos que exigem muito manuseamento e que estão durante longos períodos de tempo fora do intervalo de temperaturas recomendadas após a preparação. Os alimentos envolvidos são particularmente carnes e derivados; leite e produtos lácteos; saladas com ovo, com atum, com frango, com batata e com macarrão; aves e ovoprodutos, produtos de pastelaria recheados com creme e chocolate e recheios de sanduíches (Viegas, 2009; Lampel et al., 2012).

#### **1.7.3.9 *Bacillus cereus***

*Bacillus cereus* são bactérias anaeróbias facultativas, gram-positivas, móveis, formadoras de endósporos e que possuem atividade hemolítica. Estas bactérias encontram-se amplamente distribuídas no ambiente e podem ser isoladas a partir do solo e de vegetais em decomposição (Lampel et al., 2012).

O grupo *Bacillus cereus* abrange *Bacillus cereus sensu stricto* e outras cinco espécies estritamente relacionadas: *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus anthracis* e *Bacillus weihenstephanensis* (Frechaut, 2014). A maioria dessas bactérias são inofensivas para o homem, mas, no entanto, algumas espécies são nocivas pelas toxinas (enterotoxinas emética e diarreica) que libertam e que podem originar intoxicações. Os sintomas ligados às intoxicações causadas pelo *Bacillus cereus* incluem náuseas, câibras, diarreias aquosas, cólicas abdominais e vômitos. No entanto, esta intoxicação pode desencadear doenças mais críticas como meningite, gangrena, abscessos pulmonares e morte infantil (Viegas, 2009; Lampel et al., 2012).

Diversos produtos alimentares como leite, legumes, carnes, peixes, arroz; batatas, massas, queijos, molhos, pudins, sopas, chouriços, bolos, saladas e sanduíches de carnes têm sido associados a esta intoxicação (Viegas 2009; Lampel et al., 2012).

O *Bacillus cereus* pode ser destruído pela temperatura elevada mas, porém, não é possível desativar as suas toxinas pois que as mesmas são resistentes ao calor. Por outro lado, a bactéria pode desenvolver-se a baixas temperaturas (Lampel et al., 2012).

### 1.7.3.10 *Salmonella* spp.

As bactérias do género *Samonella* são microrganismos gram–negativos, na sua maioria móveis, não formadores de endósporos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e que apresentam forma de bastonete. A *Salmonella* é bastante dispersa na natureza e pode invadir o trato intestinal de vertebrados, envolvendo, animais selvagens, animais domésticos e seres humanos. A transmissão deste agente patogénico pode ocorrer através do contacto direto com animais infetados, por meio de material fecal contaminado ou também por contacto com água contaminada (Lampel et al., 2012).

A *Salmonella* pode ter uma grande diversidade de produtos alimentícios de origem animal ou vegetal como fonte de infeção. Os surtos têm sido associados à ingestão de alimentos contaminados como ovos, carnes, nozes cruas, especiarias, peixe, camarão, água contaminada, molhos, saladas, leite e produtos lácteos, cogumelos, misturas para bolo, sobremesas contendo ovo cru, gelatina seca, manteiga de amendoim, cacau, chocolate, frutas e vegetais (Viegas 2009). Nos últimos anos os vegetais e as frutas frescas têm sido considerados como veículo de salmonelose a nível internacional muito devido à utilização de resíduos animais como fertilizantes e de águas contaminadas como as águas de irrigação (Viegas, 2009; Lampel et al., 2012).

Os sintomas da infeção por *Salmonella* são principalmente vómitos, náuseas, diarreia aquosa, febre persistente, cólicas abdominais, dor de cabeça e sonolência. Nas pessoas com o sistema imunológico comprometido, a *Salmonella* pode dispersar-se para outros órgãos e causar doenças graves como anomalia cardíaca, anomalia circulatória e infeção intracraniana (Viegas, 2009).

### 1.7.4 Contexto e Motivação

O objetivo deste trabalho foi o de efetuar uma avaliação da qualidade microbiológica de saladas minimamente processadas e prontas a consumir disponíveis comercialmente, tentando desta forma averiguar as condições que estes alimentos possuem. A opção de analisar saladas minimamente processadas prendeu-se com o facto de ser um género alimentício muito apreciado desde as crianças aos adultos. Para este efeito definiram-se os seguintes objetivos:

- Analisar a qualidade microbiológica de saladas prontas para consumo disponíveis comercialmente em diversos estabelecimentos comerciais da região de Lisboa, centrando-se essa avaliação na pesquisa/quantificação de microrganismos aeróbios totais a 30 °C, leveduras, bolores, coliformes totais, *Staphylococcus* coagulase-positivos (*S. aureus* e outras espécies), *E. coli*, anaeróbios sulfitos redutores e *Bacillus cereus*;
- Interpretar os resultados de acordo com os Valores Guia estabelecidos pelo INSA.

## Materiais e Métodos

Este estudo foi desenvolvido durante os meses de julho a setembro de 2016, tendo sido analisadas um total de 37 amostras de saladas minimamente processadas, compostas principalmente por alface ou combinações de alface e rúcula ou alface, cenoura, couve roxa e milho.

### 2.1 Recolha de Amostras

As amostras foram recolhidas em diferentes supermercados na região de Lisboa - Portugal. Posteriormente as embalagens de saladas minimamente processadas foram transportadas em mala termoestável a 4 °C para o laboratório e analisadas de seguida.

### 2.2 Preparação de soluções e meios de cultura

#### 2.2.1 Solução de peptona-sal

Para a preparação de 500 mL da peptona-sal, pesou-se, primeiramente na balança (Denver instrument company TR-203) 4,25 g de cloreto de sódio e de seguida pesou-se 0,5 g de meio de peptona (Becton Dickinson), para um frasco com uma capacidade volumétrica de 1000 mL e por fim adicionou-se 500 mL de água ultrapura. Posteriormente realizou-se a sua esterilização através da colocação do frasco em autoclave (Darlab), a uma temperatura de 122 °C durante 15 minutos.

#### 2.2.2 Meio Triptona-bilís X-glucurónico (TBX-BioKar)

Para a realização da contagem de *E.coli* usou-se o meio desidratado Triptona-bilís X-glucurónico (TBX-BioKar). O meio TBX é um meio cromogénico seletivo para *E.coli*, pois que este meio contém sais biliares que inibem o crescimento das bactérias gram-positivas e promove a recuperação de *E. coli* e o BCIG ( 5-bromo-4-cloro-indolil- $\beta$ -D-ácido glucurónico) que quando degradado pela enzima  $\beta$  -glucoronidase, produzida pela maior parte das estirpes de

*E.coli* origina um composto azul. Geralmente as estirpes de *E.coli* diferenciam-se da maior parte da flora envolvente por possuírem a atividade da enzima glucuronidase. Assim quando a *E.coli* cresce no meio TBX origina o aparecimento de colónias azuis.

O meio TBX (Bio-Kar) apresenta a seguinte composição por 1000 mL:

- Triptona.....20,0 g
- Sais biliares.....1,5 g
- 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-  $\beta$ -D-ácido glucorónico .....75,0 mg
- Agar.....9,0g

Para a preparação de 700 mL de meio TBX, pesou-se, na balança (Denver instrument company TR-203) 21,42 g de meio desidratado TBX (BioKar), para um frasco, com uma capacidade volumétrica de 1000 mL e adicionou-se 700 mL de água ultrapura, após dissolução completa levou-se o meio ao autoclave (Darlab) para a sua esterilização a uma temperatura de 121 °C durante 15 minutos, tendo-se mantido o meio em estufa (Memmert) a uma temperatura de 40 °C até utilização.

### 2.2.3 Meio Baird-Parker RPF Agar (BioKar)

O meio Baird-Parker com plasma de coelho e fibrinogénio (RPF) é um meio utilizado para a realização da pesquisa e contagem de *Staphylococcus* coagulase-positivos (*S. aureus* e outras espécies). Este meio contém piruvato de sódio e glicina que favorecem o crescimento dos *Staphylococcus* além disso este meio possui também cloreto de lítio e telurito de potássio que inibe a maioria da microflora. A coloração preta das colónias de *Staphylococcus aureus* é devida à redução de telurito de potássio. A presença do plasma de coelho permite verificar a formação de coágulos. Assim o crescimento de *S.aureus* no meio Baird-Parker RPF origina a formação de colónias pretas ou cinzas rodeada por um halo opaco de fibrina que é bem definido, estável e bem visível.

O meio BPM (BioKar) tem a seguinte composição por 1000 mL:

- Triptona .....10,0g
- Extrato de carne... 5,0g
- Extrato de levedura.....1,0g
- Glicina .....12,0g
- Piruvato de sódio.....10,0g
- Cloreto de lítio..... 5,0 g
- Agar.....15,0 g

O suplemento RPF tem a seguinte composição:

- Plasma de coelho .....2,5 mL
- Fibrinogénio de bovino .....0,5g
- Inibidores da tripsina ..... 2,5 mg
- Telurito de potássio ..... 2,5 mg

Para a preparação de 300 mL do meio Baird-Parker (BioKar), pesou-se, na balança (Denver instrument company TR-203) 17,4 g de meio desidratado, para um frasco, com uma capacidade volumétrica de 500 mL e adicionou-se 270 mL de água ultrapura, após dissolução completa efetuou-se a sua esterilização através da colocação do frasco no autoclave (Darlab), a uma temperatura de 121 °C durante 15 minutos. De seguida colocou-se o meio de cultura numa estufa (Memmert) à temperatura de 40 °C. Imediatamente antes de se usar o meio de cultura, dissolveu-se em condições de assepsia o suplemento RPF (Plasma de coelho) em 30 mL de água destilada estéril a 37 °C, que posteriormente se adicionaram ao meio de cultura.

## **2.2.4 Meio Plate Count Agar (PCA - Becton Dickinson)**

Para a contagem e pesquisa de microrganismos totais a 30 °C utilizou-se o meio PCA este meio contém triptona, glucose e extrato de levedura. Os nutrientes fornecidos pela triptona, vitaminas do extrato de levedura e glucose aproveitados como fonte de energia promovem o crescimento da maioria das bactérias.

O meio PCA tem a seguinte composição por 1000 mL:

- Triptona .....5,0g
- Extrato de levedura..... 2,5g
- Glucose .....1,0g
- Agar.....15,0 g

Para a preparação de 500 mL do meio PCA, pesou-se, na balança (Denver instrument company TR-203) 11,75 g de meio desidratado (PCA- Becton Dickinson), para um frasco com uma capacidade volumétrica de 1000 mL e adicionou-se 500 mL de água ultrapura; após dissolução completa efetuou-se a sua esterilização através da colocação do frasco em autoclave (Darlab), a uma temperatura de 121 °C, durante 15 minutos. Por último colocou-se o meio numa estufa (Memmert) à temperatura de 40 °C até a sua utilização.

### 2.2.5 Meio Violet Red Bile Agar (VRBL-Biokar)

O meio VRBL é um meio seletivo usado para a deteção e contagem de bactérias coliformes. A seletividade deste meio é especialmente devida à presença simultânea de cristal violeta e de sais biliares que inibem as bactérias gram-positivas. As bactérias coliformes formam colónias violetas devido a fermentação da lactose e à consequente acidificação do meio.

O meio VRBL tem a seguinte composição por 1000 mL:

- Digestão péptica de carne.....7,0 g
- Extracto de levedura..... 3,0 g
- Lactose..... 10,0 g
- Sais biliares.....1,5 g
- Cloreto de sódio.....5,0 g
- Vermelho neutro..... 0,03 g
- Cristal violeta..... 0,002g
- Agar ..... 12,0 g

Para a preparação de 900 mL do meio VRBL, pesou-se, na balança (Denver instrument company TR-203) 34,65 g de meio desidratado (VRBL-Biokar), para um frasco com uma capacidade volumétrica de 1000 mL e adicionou-se 900 mL de água ultrapura; posteriormente levou-se à ebulição numa placa elétrica a uma temperatura de 95-100 °C durante 2 minutos, sob agitação. De seguida colocou-se em estufa (Memmert) à temperatura de 40 °C, até à sua utilização.

### 2.2.6 Caldo BÍlis Verde Brilhante (BGBB-Biokar)

As colónias de coliformes foram confirmadas por meio da deteção da produção de gás em Caldo BÍlis Verde Brilhante

Composição do Caldo BÍlis Verde Brilhante por 1000 mL:

- Triptona.....10g
- Lactose.....10g
- BÍlis de boi desidratada.....20g
- Verde brilhante.....0,0133

Para a preparação de 500 mL deste meio pesaram-se 20,0 g de meio BGBB (Biokar) desidratado para um frasco de 1000 mL de capacidade e adicionaram-se 500 mL de água ultrapura.

Após completa dissolução distribuiu-se o meio em volumes de 10 mL por tubos de ensaio nos quais se colocaram tubos Durham. O meio assim preparado foi esterilizado em autoclave (Darlab) a 121 °C, durante 15 minutos. A presença de gás nos tubos Durham após inoculação e incubação confirma a presença de coliformes.

### 2.2.7 Meio Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBCA- BioKar)

O RBCA é um meio utilizado para o isolamento seletivo e enumeração de leveduras e bolores. Este meio contém digestão papáica de soja e glucose que permitem o crescimento de leveduras e bolores, rose bengal que inibe o crescimento das bactérias e impossibilita a invasão de fungos na placa de Petri, ao limitar a sua propagação O cloranfenicol é um antibiótico termossensível, que possibilita um reforço da seletividade contra a maioria de bactérias. As colónias de leveduras aparecem rosa devido à assimilação do corante rose bengal.

O meio RBCA tem a seguinte composição por 1000 mL:

- Digestão papáica de soja..... 5,0 g
- Glucose.....10,0 g
- Fosfato monopotássico ..... 1,0 g
- Sulfato de magnésio,heptahidratado..... 0,5 g
- Rose bengal .....0,05 g
- Cloranfenicol .....0,1 g
- Agar .....13,0 g

Para a preparação de 1 000 mL do meio RBCA, pesou-se, na balança (Denver instrument company TR-203) 30 g de meio desidratado RBCA (Biokar), para um frasco com uma capacidade volumétrica de 1000 mL e adicionou-se 1000 mL de água ultrapura. Após dissolução completa efetuou-se a esterilização através da colocação do frasco em autoclave (Darlab), a uma temperatura de 121 °C, durante 15 minutos. O meio foi distribuído por placas de Petri que foram guardadas no frigorífico e ao abrigo da luz até à sua utilização.

### 2.2.8 Meio *Bacillus cereus* Agar (BCA-BioKar)

*Bacillus cereus* Agar é um meio utilizado para a deteção e contagem de esporos e células vegetativas de *Bacillus cereus*. O meio BCA possui triptona e extracto de carne que promovem o crescimento de *Bacillus cereus*. Além disso o meio contém também emulsão de gema de ovo que auxilia na deteção de lecitinase presente em estirpes de *Bacillus cereus*. A formação do

precipitado esbranquiçado que aparece em torno das colónias é devida à acumulação de produtos degradados insolúveis de gema de ovo. A presença de manitol auxilia na diferenciação de microrganismos contaminantes, fazendo com que o vermelho de fenol passe para amarelo, ao passo que a polimixina inibe a microflora quando a amostra testada está fortemente contaminada. Neste meio, as presumíveis colónias de *Bacillus cereus* são cor-de-rosa e geralmente rodeadas por um halo de precipitação, devido à lecitinase.

O meio *Bacillus cereus* Agar tem a seguinte composição por 1000 mL:

- Triptona.....10.0 g
- Extracto de carne ..... 1,0 g
- D-manitol .....10,0 g
- Cloreto de sódio ..... 10,0 g
- Vermelho de fenol ..... 0,025 g
- Agar .....13,5 g

Composição do suplemento da gema de ovo:

- Estéril emulsão de gema de ovo..... 100,0 mL
- Polimixina B ..... 1 x 105 IU

Para a preparação de 630 mL do meio *Bacillus cereus* Agar, pesou-se, na balança (Denver instrument company TR-203) 31,15 g de meio desidratado *Bacillus cereus* Agar (Bio-kar), para um frasco com uma capacidade volumétrica de 1000 mL e adicionou-se 630 mL de água ultra-pura. Após dissolução completa, procedeu-se à sua esterilização através da colocação do frasco na autoclave (Darlab), a uma temperatura de 121 °C, durante 15 minutos. Posteriormente, em condições de assepsia, adicionaram-se 70 mL de emulsão de gema de ovo com polimixina B. O meio assim preparado foi distribuído por placas de Petri estéreis e usado após solidificação.

### 2.2.9 Meio Triptona Sulfito Cicloserina Agar (TSC-BioKar)

O meio TSC é um meio seletivo para o isolamento e contagem de bactérias anaeróbias sulfitorredutoras. A triptona fornece azoto e outros nutrientes indispensáveis para suportar o crescimento bacteriano. A presença de bactérias redutoras de sulfito é indicada pela formação de colónias negras. Estas colónias originam-se quando as bactérias reduzem o sulfito de sódio a sulfureto, o qual reage com o ferro (III) originando um precipitado negro (ISO 15213 2003).

O meio TSC (Biokar) tem a seguinte composição por 1000 mL:

- Triptona.....15.0 g
- Digestão papáica de soja .....5,0 g



- Extracto de levedura..... 5,0 g
- Metabissulfito de sódio ..... 1,0 g
- Citrato de amónio férrico .....1,0 g
- D-cicloserina.....0.4 g
- Agar ..... 15,0

Para a preparação de 600 mL de meio TSC, pesou-se, na balança (Denver instrument company TR-203) 25,2 g de meio desidratado TSC (Biokar), para um frasco com uma capacidade volumétrica de 1000 mL e adicionou-se 600 mL de água ultrapura. Após dissolução completa efetuou-se a sua esterilização através da colocação do frasco em autoclave (Darlab), a uma temperatura de 121 °C, durante 15 minutos. Por último colocou-se o meio numa estufa (Memmert) à temperatura de 40 °C até à sua utilização

## 2.3 Métodos de enumeração e determinação dos microrganismos

A enumeração e determinação dos diversos microrganismos foi efetuada de acordo as normas ISO (Organização Internacional de Normalização). Este padrão internacional especifica métodos horizontais para a enumeração e determinação de diferentes microrganismos e é aplicável aos produtos alimentícios destinados ao consumo humano e ao consumo de animais e amostras ambientais na área de produção de alimentos e manipulação de alimentos (ISO 15213: 2003).

Para preparar a suspensão inicial pesaram-se, em condições de assepsia, 10 g de cada uma das amostras e adicionou-se 90 mL de água peptonada. A suspensão foi fortemente agitada durante 4 minutos, tendo, de seguida, sido preparadas diluições seriadas de 1 para 10 em água peptonada.

### 2.3.1 Método horizontal de enumeração de *Escherichia coli* de acordo com a ISO 16649-2:2001.

Com ajuda de uma micropipeta transferiu-se 1 mL da suspensão inicial e das diversas diluições para placas de Petri estéreis às quais se adicionou de imediato o meio de cultura TBX. Posteriormente, após a secagem, incubaram-se as placas em estufa (Mettler) à temperatura de 44°C durante 24 horas. Após o período de incubação realizou-se a enumeração das colónias azuis (colónias típicas) ou seja UFC de *E.coli*,  $\beta$ -glucoronidase-positivas, em placas de Petri que continham menos de 150 colónias típicas e menos de 300 colónias totais para as diferentes diluições.

### **2.3.2 Método horizontal de enumeração de *Staphylococcus coagulase* positiva de acordo com a ISO 6888-02:1999.**

Utilizando uma micropipeta transferiu-se 1 mL da suspensão inicial e das diversas diluições para placas de Petri estéreis. Seguidamente procedeu-se ao seu preenchimento com meio Baird Parker (BioKar) já suplementado com RPF (plasma de coelho/fibrinogénio) e misturou-se cuidadosamente. Depois da secagem, incubaram-se as placas de Petri numa estufa (Memmert) a temperatura de 37 °C durante 24 horas. Após o período de incubação realizou-se a contagem das colónias pretas ou cinzentas rodeadas por um halo de precipitação (colónias típicas) características de *Staphylococcus coagulase*-positiva.

### **2.3.3 Método horizontal de enumeração de Microrganismos totais a 30°C, segundo a ISO 4833-1:2013**

Utilizando uma micropipeta transferiu-se 1 mL da suspensão inicial e das diversas diluições para placas de Petri estéreis às quais se adicionou de imediato o meio de cultura PCA (Becton Dickinson) e misturou-se cuidadosamente. Após a secagem, as placas foram incubadas em estufa (Memmert) a temperatura de 30 °C durante 72 horas. No final do período de incubação procedeu-se à contagem de todas as colónias formadas nas placas que continham até um máximo de 300 UFC.

### **2.3.4 Método horizontal de enumeração de bactérias coliformes de acordo com a ISO 4832:2006.**

Utilizando uma micropipeta transferiu-se 1 mL da suspensão inicial e das diversas diluições para placas de Petri estéreis às quais se adicionou de seguida meio VBRL (Biokar) e misturou-se cuidadosamente. Após a solidificação do meio, adicionou-se uma segunda camada (*overlay*) de 4 mL de meio VRBL sobre a superfície do meio já inoculado. Após solidificação desta segunda camada as placas de Petri foram incubadas em estufa (Memmert) à temperatura de 37 °C durante 24 horas. Imediatamente ao período de incubação foram selecionadas apenas as placas de Petri com mais de 10 e menos de 150 colónias e foram enumeradas todas as colónias púrpuras ou violetas (colónias típicas).

Realizou-se o teste de confirmação através da seleção de cinco colónias de cada tipo diferente, que foram transferidas para tubos que continham o meio verde brilhante. Os tubos assim inoculados foram posteriormente incubados em estufa (Memmert) a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente ao período de incubação observou-se a produção de gás nos tubos.

### **2.3.5 Método horizontal de enumeração de *Bacillus cereus* de acordo com a ISO 7932:2004.**

Utilizando uma micropipeta inocularam-se 100 µL da suspensão inicial e das suas diluições em placas de Petri contendo o meio BCA já suplementado com gema de ovo e polixina B. Cuidadosamente espalhou-se o inóculo tão rapidamente quanto possível ao longo da superfície da placa de agar, sem roçar os lados das placas com o espalhador estéril. Depois de secas incubaram-se as placas de forma não invertidas na estufa (Memmert) à temperatura de 30 °C durante 24 horas. Posteriormente ao período de incubação fez-se a contagem das colónias típicas que indicam a presumível presença de *B. cereus*. Essas colónias são grandes, cor-de-rosa geralmente rodeada por um halo de precipitação em placas contendo menos de 150 UFC.

### **2.3.6 Método horizontal de enumeração de bolores e leveduras de acordo com a ISO 21527-1:2008.**

Utilizando uma micropipeta inocularam-se 100 µL da suspensão inicial e das suas diluições em placas de Petri contendo o meio DRBC e espalhou-se o inóculo sobre a superfície da placa utilizando um espalhador estéril. Após a secagem do meio, as placas foram incubadas na estufa (Memmert) à temperatura de 25 °C, durante cinco dias, sem serem invertidas de modo a evitar a disseminação dos esporos. Posteriormente ao período de incubação fez-se a contagem das placas com menos de 150 colónias, em que os bolores foram enumerados separadamente das leveduras.

### **2.3.7 Método horizontal de enumeração de Bactérias anaeróbias sulfito-redutoras de acordo com a ISO 15213:2003.**

Utilizando uma micropipeta transferiu-se 1 mL da suspensão inicial e das diversas diluições para placas de Petri estéreis às quais se adicionou de seguida 15 mL de meio TSC (Biokar) e misturou-se cuidadosamente. Após a solidificação do meio, adicionou-se mais uma camada de 5 mL do mesmo meio. Após a secagem desta segunda camada incubaram-se as placas de Petri em caixa de anaerobiose em estufa (Memmert) a 37 °C durante 48 horas. Logo após o período de incubação procedeu-se à enumeração de colónias pretas características de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras, nas placas de Petri contendo menos de 150 colónias típicas e menos de 300 colónias totais.

# 3

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo principal a avaliação da qualidade microbiológica de saladas prontas-a-comer, comercializadas em superfícies comerciais da região de Lisboa, nomeadamente salada camponesa constituída por alface, cenoura ripada, milho e couve roxa ripada; salada Ibérica composta por alface e rúcula selvagem e salada simples de alface tipo iceberg ou tipo frisada.

Neste campo de ação foram analisadas 37 amostras, sendo 11 amostras de salada camponesa; 8 amostras de salada ibérica; 9 amostras de salada de alface iceberg e também 9 amostras de salada de alface frisada. As amostras, de diferentes marcas, foram adquiridas em diferentes superfícies comerciais.

Apesar do Regulamento (CE) nº 1441/2007, estabelecer para os produtos hortofrutícolas minimamente processados, como critério de segurança dos produtos alimentícios, a pesquisa de *Salmonella* spp e enumeração de *Listeria monocytogenes* e como critério de higiene a enumeração de *Escherichia coli*, decidiu realizar-se a análise a outros parâmetros por poderem oferecer informações relevantes na avaliação microbiológica de saladas minimamente processadas. Cada salada foi analisada em relação a parâmetros indicadores de higiene e quantificação/detecção de microrganismos patogénicos. Assim, as amostras foram analisadas em relação a contagem de microrganismos totais a 30 °C, contagem de bolores, contagem de leveduras, contagem de coliformes totais, contagem de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras, contagem de *E. coli*, contagem de *Staphylococcus* coagulase-positivos (*S. aureus* e outras espécies) e contagem de colónias presuntivas de *B. cereus*, perfazendo um total de 296 análises.

Os parâmetros microbiológicos analisados foram escolhidos tendo por base os Valores Guia estipulados pelo INSA (Santos et al., 2005). A interpretação dos resultados microbiológicos baseada nos Valores Guia, INSA, é executada em quatro níveis (Santos et al. 2005):

**Satisfatório** – Os resultados analíticos indicam uma boa qualidade microbiológica.

**Aceitável** – Os resultados analíticos indicam que o produto se encontra dentro dos limites estabelecidos.

**Não Satisfatório** – Os resultados analíticos indicam que produto não satisfaz um ou mais dos valores estabelecidos.

**Inaceitável/ Potencialmente Perigoso** – os resultados analíticos indicam a presença de microrganismos patogénicos ou toxinas que poderão constituir um risco para a saúde.

### 3.1. RESULTADOS DAS AMOSTRAS ANALISADAS

Os resultados das análises microbiológicas encontram-se nas tabelas 3.1, 3.2, 3.3, e 3.4.

**Tabela 3.1. Resultados das análises microbiológicas realizadas às amostras de salada ibérica (alface verde, alface roxa e rúcula selvagem).**

Amostras	Microrganismos							
	Contagem de microrganismos totais a 30°C (log UFC.g)	Contagem de leveduras (log UFC.g)	Contagem de Bolores (log UFC.g)	Contagem de Coliformes totais (log UFC.g)	Contagem de <i>E.coli</i> (log UFC.g)	Contagem de Anaeróbios sulfito reductores (log UFC.g)	Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (log UFC.g)	Contagem de <i>Bacillus cereus</i> (log UFC.g)
I1	7,18	4,15	<2	5,43	<1	<1	<1	3,07
I2	7,04	4,31	<2	6,00	<1	<1	1,70	<2
I3	PNR	3,32	<2	4,76	<1	<1	<1	3,60
I4	PNR	4,50	<2	6,19	<1	<1	<1	0,00
I5	7,51	3,37	3,09	6,25	>1<2	>1<2	3,79	2,85
I6	7,81	3,99	2,30	4,73	<1	<1	<1	<2
I7	8,48	PNR	4,60	PNR	PNR	PNR	PNR	0,00
I8	7,05	PNR	<2	PNR	PNR	PNR	3,32	6,45
Níveis de qualidade microbiológica	Microrganismos totais 30° C	Leveduras	Bolores	Coliformes totais	<i>E.coli</i>	Anaeróbios sulfito reductores	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<i>Bacillus cereus</i>
Satisfatório	≤4	≤2	≤2	≤2	≤1	≤1	<2	≥2
Aceitável	>4≤6	>2≤5	>2≤3	>2≤4	>1<2	>1≤3	NA	>2 ≤3
Não Satisfatório	>6	>5	>3	>4	≥2	>3<4	≥2≤4	>3<5
Potencialmente perigoso	NA	NA	#	NA	NA	≥4#	>4	≥5
Parâmetro não realizado	PNR							

PNR) Parâmetro não realizado; NA) Não aplicável; #) Valor a avaliar caso a caso

Relativamente às amostras de salada ibérica analisadas verificou-se em muitos casos valores na gama do não aceitável e mesmo, num único caso, do potencialmente perigoso. Dos vários parâmetros analisados a contagem de leveduras, contagem de *E. coli* e a contagem de anaeróbios sulfito-redutores foram os únicos onde se conseguiu uma percentagem de 100% de resultados satisfatórios/aceitáveis. Na contagem de bolores obteve-se uma percentagem de resultados satisfatórios/aceitáveis de 75% e na de *Staphylococcus* coagulase-positivos de 71%. Os piores resultados foram obtidos na contagem de coliformes totais e de microrganismos a 30 °C, onde não se conseguiu obter uma única análise com um valor satisfatório ou aceitável, e na contagem de colónias presuntivas de *B. cereus* onde se obteve um resultado potencialmente perigoso. Convém, no entanto ressaltar que não se efetuou a confirmação das colónias pelo que este resultado é apenas presuntivo e não pode ser totalmente validado.

**Tabela 3.2. Resultados das análises microbiológicas realizadas às amostras de salada camponesa (alface, cenoura ripada, milho e couve roxa ripada).**

Amostras	Microrganismos							
	Contagem de microrganismos totais a 30°C (log UFC.g)	Contagem de leveduras (log UFC.g)	Contagem de Bolores (log UFC.g)	Contagem de Coliformes totais (log UFC.g)	Contagem de <i>E.coli</i> (log UFC.g)	Contagem de Anaeróbios sulfito redutores (log UFC.g)	Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (log UFC.g)	Contagem de <i>Bacillus cereus</i> (log UFC.g)
C1	8,13	4,84	<2	>6	<1	<1	1,00	<2
C2	6,48	4,24	3,70	5,87	<1	<1	2,60	<2
C3	7,72	4,88	<2	>6,48	<1	<1	1,00	4,28
C4	PNR	4,59	<2	>6	<1	<1	<1	0,00
C5	7,65	5,18	<2	6,36	<1	<1	3,18	<2
C6	8,48	5,63	2	>6,48	<1	<1	2,95	<2
C7	8,22	5,92	<2	>6,48	<1	<1	3,26	<2
C8	8,25	4,94	3,30	>6,48	>1<2	<1	2,48	<2
C9	PNR	6,07	4,00	PNR	PNR	<1	2,78	<2
C10	7,92	5,79	4,60	PNR	PNR	PNR	PNR	6,41
C11	8,04	6,34	<2	PNR	PNR	PNR	PNR	PNR
Níveis de qualidade microbiológica	Microrganismos totais 30° C	Leveduras	Bolores	Coliformes totais	<i>E.coli</i>	Anaeróbios sulfito redutores	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<i>Bacillus cereus</i>
Satisfatório	≤ 4	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 1	≤ 1	< 2	≥ 2
Aceitável	> 4 ≤ 6	> 2 ≤ 5	> 2 ≤ 3	> 2 ≤ 4	>1< 2	> 1 ≤ 3	NA	> 2 ≤ 3
Não Satisfatório	> 6	> 5	> 3	> 4	≥ 2	> 3< 4	≥ 2 ≤ 4	> 3< 5
Potencialmente perigoso	NA	NA	#	NA	NA	≥ 4 #	> 4	≥ 5
Parâmetro não realizado	PNR							

PNR) Parâmetro não realizado; NA) Não aplicável; #) Valor a avaliar caso a caso

Em relação às amostras de salada camponesa os melhores resultados foram obtidos nas contagens de *E. coli* e anaeróbios sulfito-redutores, onde todas as análises apresentaram resultados satisfatórios/aceitáveis. Os resultados para as contagens de leveduras, bolores e *Staphy-*

*lococcus* coagulase-positivos apresentaram percentagens de resultados satisfatórios/aceitáveis de 45,5%, 63,6% e 66,7%, respetivamente. Mais uma vez, os piores resultados foram obtidos nas contagens de coliformes totais e de microrganismos a 30 °C, onde não se conseguiu obter uma única análise com um valor satisfatório ou aceitável, e na contagem de colónias presuntivas de *B. cereus* onde se obteve um resultado potencialmente perigoso, ressaltando-se, mais uma vez que as colónias não foram confirmadas.

**Tabela 3.3. Resultado das análises microbiológicas realizadas às amostras de salada de alface iceberg.**

Amostras	Microrganismos							
	Contagem de microrganismos totais a 30°C (log UFC.g)	Contagem de leveduras (log UFC.g)	Contagem de Bolores (log UFC.g)	Contagem de Coliformes totais (log UFC.g)	Contagem de <i>E.coli</i> (log UFC.g)	Contagem de Anaeróbios sulfito redutores (log UFC.g)	Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (log UFC.g)	Contagem de <i>Bacillus cereus</i> (log UFC.g)
IC1	7,58	3,15	<2	4,89	<1	< 1	2,60	4,48
IC2	5,40	2,48	<2	4,25	<1	< 1	<1	2,00
IC3	7,54	4,07	3,11	5,46	< 1	< 1	1,00	0,0
IC4	8,48	3,18	2	5,61	<1	< 1	<1	0,0
IC5	6,98	4,50	3,70	4,71	< 1	< 1	3,68	3,30
IC6	7,22	4,61	<2	6,11	< 1	<1	3,52	<2
IC7	6,99	3,00	<2	5,87	< 1	>1<2	2,95	<2
IC8	7,20	PNR	PNR	> 6,48	PNR	PNR	2,57	5,30
IC9	5,47	PNR	PNR	5,24	PNR	PNR	2,46	<2
Níveis de qualidade microbiológica	Microrganismos totais 30° C	Leveduras	Bolores	Coliformes totais	<i>E.coli</i>	Anaeróbios sulfito redutores	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<i>Bacillus cereus</i>
Satisfatório	≤4	≤2	≤2	≤2	≤1	≤1	<2	≥2
Aceitável	>4≤6	>2≤5	>2≤3	>2≤4	>1<2	>1≤3	NA	>2 ≤3
Não Satisfatório	>6	>5	>3	>4	≥2	>3<4	≥2≤4	>3<5
Potencialmente perigoso	NA	NA	#	NA	NA	≥4#	>4	≥5
Parâmetro não realizado	PNR							

PNR) Parâmetro não realizado; NA) Não aplicável; #) Valor a avaliar caso a caso

No caso das amostras de salada de alface tipo iceberg os resultados obtidos apresentaram uma tendência muito semelhante ao das amostras anteriores. Assim, mais uma vez os melhores resultados foram encontrados nas contagens de *E. coli*, leveduras e de anaeróbios sulfito-redutores e os piores nas contagens de *Staphylococcus* coagulase-positivos, coliformes totais, microrganismos totais a 30 °C e *B. cereus*. No entanto, apesar de todas as amostras continuarem a ser consideradas não satisfatórias, as contagens de coliformes foram consideravelmente inferiores às obtidas nas amostras de salada camponesa.

**Tabela 3.4. Resultado das análises microbiológicas realizadas às amostras de salada de alface frisada.**

Amostras	Microrganismos							
	Contagem de microrganismos totais a 30°C (log UFC.g)	Contagem de leveduras (log UFC.g)	Contagem de Bolores (log UFC.g)	Contagem de Coliformes totais (log UFC.g)	Contagem de <i>E.coli</i> (log UFC.g)	Contagem de Anaeróbios sulfito reductores (log UFC.g)	Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (log UFC.g)	Contagem de <i>Bacillus cereus</i> (log UFC.g)
F1	6,31	3,16	3,55	5,43	1	<1	2,32	<2
F2	8,48	4,36	2,00	4,82	>1<2	<1	2,70	2,48
F3	6,47	3,91	2,48	5,05	<1	<1	2,30	<2
F4	7,43	4,28	<2	6,37	<1	<1	1,95	0,00
F5	7,13	3,85	2	5,53	<1	<1	3,85	<2
F6	7,16	4,18	3,22	6,22	>1<2	<1	3,43	<2
F7	7,16	3,78	<2	6,26	<1	>1<2	3,38	<2
F8	7,18	4,23	2,30	5,91	<1	<1	3,77	<2
F9	7,14	PNR	PNR	6,01	PNR	PNR	3,06	5,30
Níveis de qualidade microbiológica	Microrganismos totais 30° C	Leveduras	Bolores	Coliformes totais	<i>E.coli</i>	Anaeróbios sulfito reductores	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<i>Bacillus cereus</i>
Satisfatório	≤4	≤2	≤2	≤2	≤1	≤1	<2	≥2
Aceitável	>4≤6	>2≤5	>2≤3	>2≤4	>1<2	>1≤3	NA	>2 ≤3
Não Satisfatório	>6	>5	>3	>4	≥2	>3<4	≥2≤4	>3<5
Potencialmente perigoso	NA	NA	#	NA	NA	≥4#	>4	≥5
Parâmetro não realizado	PNR							

PNR) Parâmetro não realizado; NA) Não aplicável; #) Valor a avaliar caso a caso

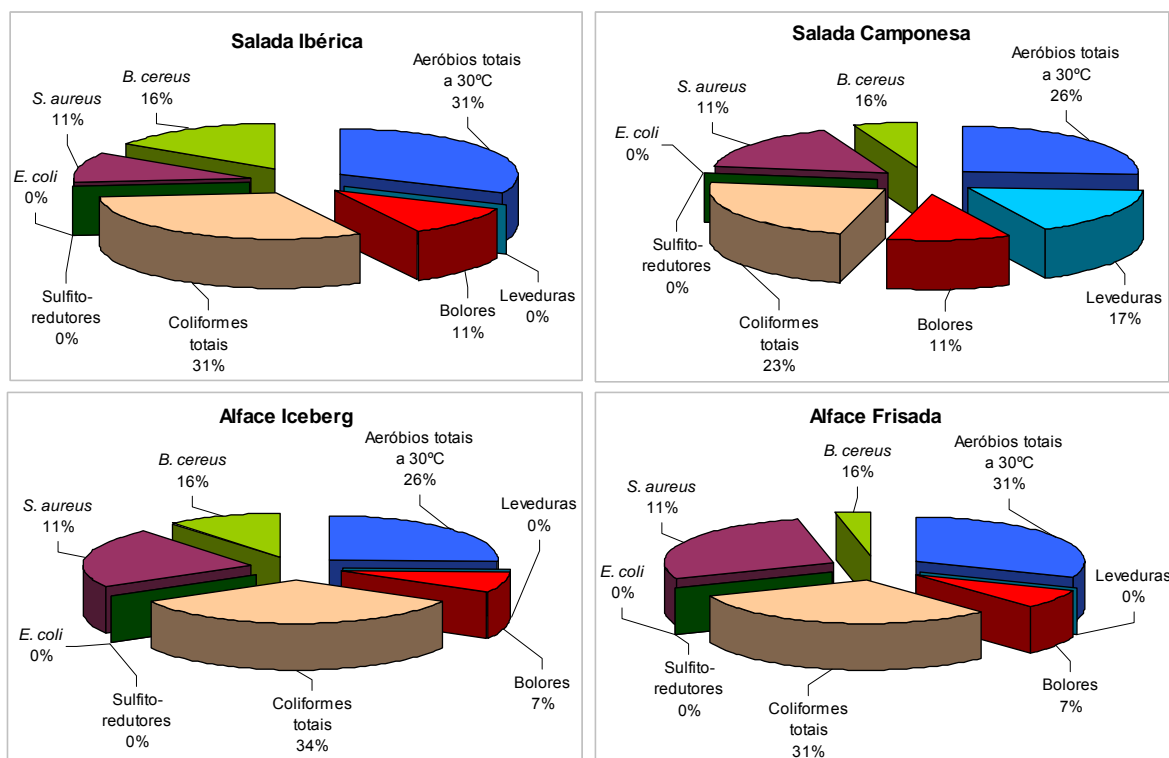
No caso das amostras de salada de alface tipo frisada/mil folhas, os melhores resultados foram obtidos nas contagens de leveduras, de *E. coli* e de anaeróbios sulfito-redutores, com 100% de resultados dentro do satisfatório/aceitável. A contagem de bolores apresentou uma percentagem de resultados satisfatórios/aceitáveis de 87,5. Os piores resultados foram encontrados nas contagens de *Staphylococcus* coagulase-positivos, coliformes e microrganismos totais a 30 °C, com uma percentagem de resultados não satisfatórios entre os 90 e os 100%. Mais uma vez, no caso do *B. cereus*, apesar da generalidade das amostras ter apresentado resultados aceitáveis/satisfatórios houve uma que apresentou um resultado potencialmente perigoso, mas, mais uma vez se realça o facto destes resultados serem apenas presuntivos uma vez que as colónias não foram confirmadas.

Olhando para os resultados de uma forma integrada e global, é possível verificar que todas as amostras de saladas analisadas cumpriram o limite legal fixado pelo Regulamento (CE) N° 1441/2007 em relação à *E. coli*, único dos parâmetros analisados que tem este tipo de limite.

Os resultados mostraram que as amostras de salada ibérica, camponesa, alface iceberg e alface frisada apresentaram um índice elevado de contaminação, com especial referência para microrganismos totais a 30 °C, coliformes totais, *Staphylococcus* coagulase positiva e presumivelmente de *Bacillus cereus*. A Figura 3.1 mostra a contribuição de cada um dos parâmetros



microbiológicos determinados para o total de resultados não satisfatórios/potencialmente perigosos obtidos com cada um dos tipos de saladas analisadas. A observação dessa Figura permite verificar que no seu conjunto os microrganismos totais a 30 °C e os coliformes totais representaram sempre 49 a 62% do total de resultados não satisfatórios obtidos.



**Figura 3.1. Contribuição de cada um dos parâmetros microbiológicos determinados para o total de resultados não satisfatórios/potencialmente perigosos obtidos com cada um dos tipos de salada analisados.**

Os valores elevados de contagens de microrganismos aeróbios totais a 30 °C pode indicar que as amostras poderiam já apresentar alterações organoléticas. Com efeito, Ragaert et al. (2004), relataram que podem ocorrer alterações organoléticas evidentes em vegetais quando a contagem bacteriana é maior do que 7 ou 8 log UFC.g. As contagens de microrganismos totais a 30 °C e de coliformes totais são dois parâmetros úteis para avaliar as condições de higiene durante a fase de processamento, as condições sanitárias dos utensílios e dos equipamentos, as condições de armazenagem e distribuição (FAO, 2016). Assim, a presença de contagens elevadas destes dois parâmetros nas amostras em estudo revela uma forte contaminação inicial das saladas e, possivelmente, alguma necessidade de melhorar as condições em que é realizada a sua preparação.

No caso de *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Bacillus cereus* a ocorrência destes microrganismos indicam a prevalência de patogénicos e de toxinas que podem por em risco a saúde do consumidor. Desta forma, os resultados não satisfatórios obtidos nestes parâmetros podem acarretar consequências mais graves. Contudo, mais uma vez é importante ressaltar que na análise de *Bacillus cereus* não se procedeu à confirmação das colónias obtidas no ensaio presuntivo pelo que os resultados obtidos podem não corresponder aos reais e serem

ser mais elevados do que estes. Também no caso dos *Staphylococcus* coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies) os resultados podem apresentar algum desvio uma vez que o método aplicado não é o mais indicado para a pesquisa destes microrganismos neste tipo de amostras.

De um modo geral, as amostras de salada camponesa apresentaram contagens de coliformes totais e de microrganismos aeróbios totais a 30 °C mais elevadas do que as restantes amostras e as saladas de alface iceberg mais baixas. A diferença destes resultados pode residir na morfologia das folhas e dos restantes constituintes das saladas que podem auxiliar a aglomeração de sujidade e de adesão de bactérias (Cardamone et al., 2015). Outra possível explicação para as diferenças de resultados pode residir nas diferenças de nutrientes existentes nas várias saladas, que pode, de algum modo favorecer mais ou menos o desenvolvimento microbiano.

Outros estudos efetuados com vegetais minimamente processados têm evidenciado a existência de contagens elevadas de microrganismos a 30 °C e de coliformes totais. Um estudo realizado no México por Cerna-Cortes et al. (2015), revelou que as bactérias aeróbias mesófilas foram encontradas em 100% das amostras de saladas minimamente processadas analisadas; sendo que 59% das amostras não se encaixava dentro dos padrões (contagens superiores a 5,17 log CFU por g). Em relação a 100 amostras de rebentos de vegetais os autores verificaram que todas as amostras foram positivas para microrganismos totais a 30 °C e para coliformes totais e 69% para coliformes fecais.

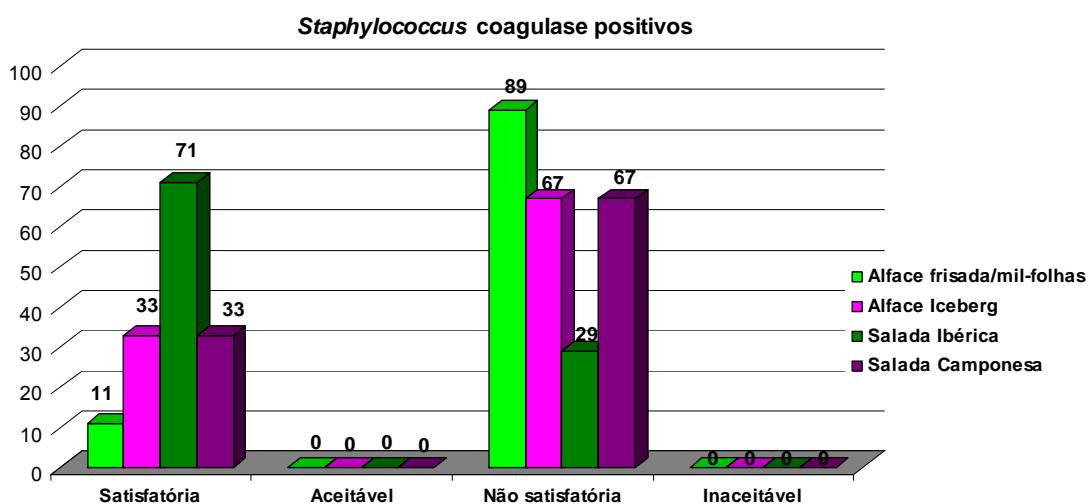
Coniglio et al. (2016), analisou 100 amostras de saladas prontas a consumir à venda em superfícies comerciais na Catania (Itália) e verificou que 100% das amostras analisadas se encontravam contaminadas com microrganismos a 30 °C (contagens médias entre os 6 e os 7 log UFC.g), que 25% das amostras se encontravam contaminadas com coliformes (contagens médias entre os 4 e os 5 log UFC.g) e 10% com *E. coli* (contagens médias de cerca de 2 log UFC.g). Os autores concluíram que o processamento tecnológico mínimo que estes produtos recebem antes da sua distribuição e comercialização, na maioria dos casos é insuficiente para garantir contagens microbiológicas mais satisfatórias (Cardamone et al., 2015; Coniglio et al., 2016).

A presença de microrganismos em saladas pode estar associada a vários fatores como manipulação excessiva dos alimentos, desinfetação inadequada, utilização de água imprópria para a lavagem dos vegetais, contaminação cruzada por meio de vegetais deteriorados ou a utilização de utensílios de processamento não higienizados (Sabbithi et al., 2014).

Cardamone et al. (2015) afirma que a contaminação dos produtos minimamente processados por microrganismos pode estar relacionada com as falhas em sistemas de avaliação e gestão de risco em instalações de processamento, onde as proveniências de contaminação podem ser diversas, nomeadamente do solo, da água de rega ou do ambiente de processamento. Além disso a lavagem e a desinfecção podem não facultar uma eliminação completa de patogénicos destes produtos, sendo imprescindível seguir com precisão as Boas Práticas de Fabrico e de Higiene ao longo de toda cadeia alimentar (desde o campo a mesa) a fim de atingir os objetivos da segurança alimentar.

### 3.1.1. *Staphylococcus coagulase positiva*

Na pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva* analisaram-se 34 amostras sendo nove de salada de alface frisada (alface frisada ou mil-folhas); nove também de salada de alface iceberg (alface iceberg), sete de salada ibérica (alface verde, alface roxa e rúcula selvagem) e nove de salada camponesa (alface verde, cenoura ripada, couve roxa ripada e milho). De acordo com os critérios estabelecidos pelos valores Guia, INSA para avaliação da qualidade microbiológica de saladas dessas 34 análises somente 12 obtiveram resultados satisfatórios sendo um (11%) em salada de alface frisada; três (33%) em salada de alface iceberg; cinco (71%) em salada ibérica e três (33%) em salada camponesa. Dos 22 resultados não satisfatórios oito (89%) verificaram-se em saladas de alface frisada; seis (67%) em salada de alface iceberg; dois (29%) em salada ibérica e seis (67%) em salada camponesa (Figura 3.2). Contudo, a análise destes resultados tem de ser feita com reserva, visto que pode vir afetado pelo facto do método aplicado (ISO 6888, parte 2) não ter sido o mais indicado para a deteção destes microrganismos neste tipo de amostras (ISSO 6888, parte 1).



**Figura 3.2. Percentagem de resultados satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis/potencialmente perigosos de *Staphylococcus coagulase positivos* nas várias amostras de saladas prontas-a-consumir analisadas.**

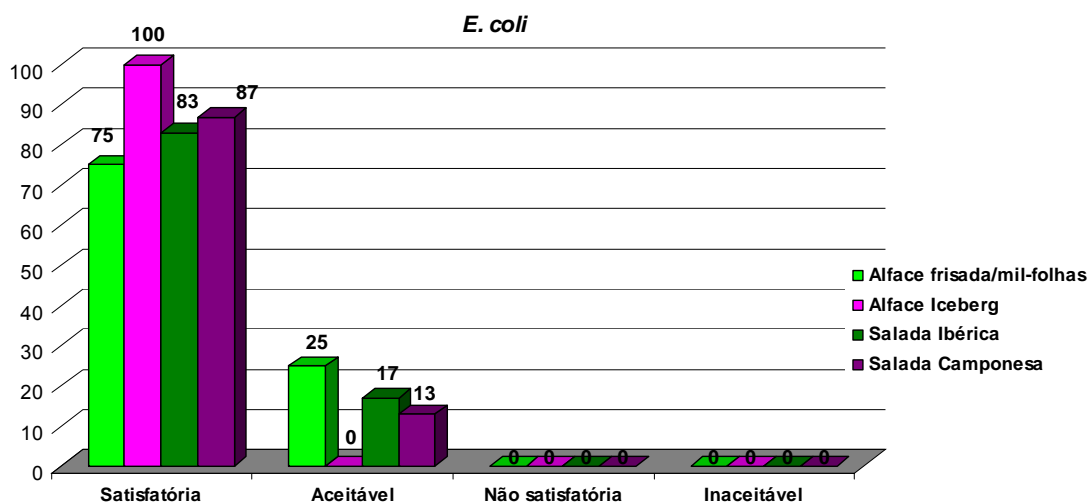
Soriano et al. (2000) realizaram um estudo em alface servidas numa cantina universitária em Espanha, em que na pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva* observaram resultados positivos em 25% das amostras analisadas (144) mesmo após a lavagem da alface com uma solução aquosa de hipoclorito e de permanganato de potássio. Numa pesquisa realizada por Palú et al. (2002) sobre avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas de restaurantes de *self-service*, no universo de 30 amostras analisadas 53% estavam infetadas com *Staphylococcus coagulase positiva*. Entretanto num estudo efetuado por Filipe (2005) em Portugal de avaliação microbiológica a múltiplos produtos hortícolas, nomeadamente rúcula, salsa, agrião, rebentos de soja e rebentos de luzerna, nenhuma das amostras analisadas revelou a presença de *Staphylococcus coagulase positiva*. Numa investigação feita por Trindade (2014) também em Portugal, em saladas de alface e de cenoura, na pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva* observaram-se resultados positivos tanto na salada de alface como na salada de cenoura. No entanto, nas saladas de alface detetou-se a presença de *Staphylococcus coagula-*

se positiva em 30% das amostras, enquanto nas saladas de cenoura este microrganismo apenas foi detetado em 5% das amostras analisadas.

Fazendo uma análise dos resultados obtidos nesta pesquisa, ressaltando mais uma vez o desvio que pode derivar do método utilizado, a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva pode estar associada a excessiva e inadequada manipulação dos alimentos, a falta de higienização, a manutenção dos produtos a temperatura inconveniente por longos períodos de tempo e além disso pode, eventualmente, também estar associado com manipuladores infectados (Sabbithi et al., 2014; Trindade, 2014).

### 3.1.2. *Escherichia coli*

Na pesquisa de *E. coli* analisaram-se 29 amostras sendo oito de salada de alface frisada (alface frisada ou mil-folhas); sete de salada de alface iceberg (alface iceberg), seis de salada ibérica (alface verde, alface roxa e rúcula selvagem) e oito de salada camponesa (alface verde, cenoura ripada, couve roxa ripada e milho). Todas essas amostras se encontravam conformes de acordo com o Regulamento (CE) N° 1441/2007 e aceitáveis ou satisfatórias de acordo com os critérios estabelecidos pelos valores Guia, INSA para avaliação da qualidade microbiológica de saladas. Do universo de amostras de salada de alface frisada analisadas, 75% (6) foram satisfatórias, 25% (2) foram aceitáveis. Em relação às amostras de salada de alface iceberg todas as amostras 100% (7) foram satisfatórias. No caso da salada ibérica 83% (5) das amostras analisadas foram satisfatórias e 17% (1) das amostras foi aceitável. Por último, nas amostras de salada camponesa obtiveram-se 87% (7) de amostras satisfatórias e 13 % (1) de amostras aceitáveis (Figura 3.3).



**Figura 3.3. Percentagem de resultados satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis/potencialmente perigosos de *E. coli* nas várias amostras de saladas prontas-a-consumir analisadas.**

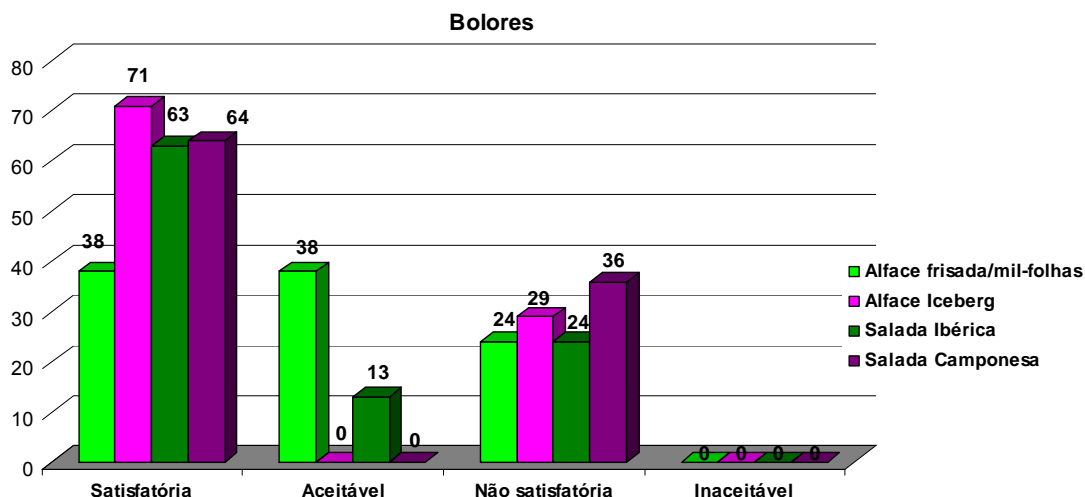
Os resultados obtidos estão em conformidade com a generalidade dos resultados descritos pela literatura, que apontam para baixas percentagens de produtos vegetais contaminados com *E. coli*. Noutro estudo realizado em Portugal, Campos et al., (2010) examinaram 50 amostras embaladas de saladas prontas para o consumo, pertencentes a sete marcas nas quais verificaram apenas 4% de amostras não conformes em relação a *E. coli*. As amostras não conformes foram verificadas em saladas de folhas mistas e também a saladas de folhas mistas juntamente com cenoura e milho.

Outro estudo efetuado, igualmente, em Portugal por Trindade (2014) de avaliação microbiológica as saladas de alface ripadas e de cenouras raladas constatou-se que 95% das saladas de alface examinadas foram satisfatórias e 5% aceitáveis. Entretanto, em relação às saladas de cenoura analisadas verificou-se que 10% das amostras foram não satisfatórias, 15% aceitáveis e 75% satisfatórias.

A aplicação de Boas práticas de higiene com rigor pode auxiliar a restringir o risco de enfermidades relacionada com a presença de microrganismo de origem fecal, como é o caso da *E. coli*. Assim, a presença deste organismo em número elevado indica uma contaminação das matérias-primas, lavagem e desinfecção mal feitas, higiene inadequada na produção e temperatura inconveniente durante a fase de produção ou conservação dos produtos (Soncy et al. 2015). O facto dos resultados obtidos no presente trabalho mostrarem valores aceitáveis de *E. coli* (amostras conformes, aceitáveis ou satisfatórias) sugere que, em relação a esta bactéria as boas práticas de higiene têm estado a ser, de um modo geral, corretas, facto que pode estar relacionado com a existência de um limite legal para este parâmetro.

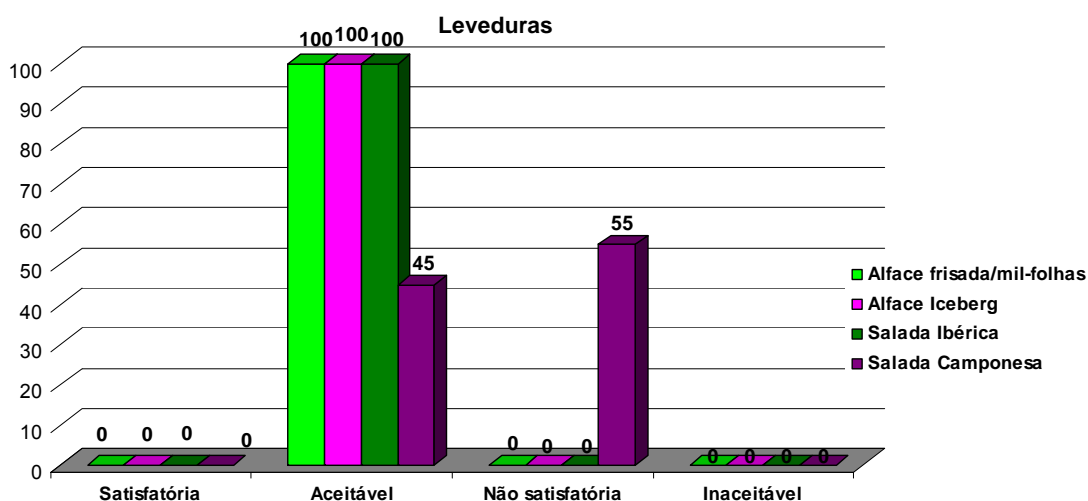
### **3.1.3. Bolores e Leveduras**

Em relação à pesquisa de bolores foi possível verificar a sua presença em todas as amostras de saladas analisadas. Do universo global de 34 amostras analisadas, 20 foram satisfatórias, encontrando-se 38% (3) em amostras de salada de alface frisada; 71% (5) em amostras de salada de alface iceberg; 63% (5) em amostras de salada ibérica e 64% (7) em amostras de salada camponesa. Das amostras aceitáveis, 38% (3) ocorreram em amostras de salada de alface frisada e 13% (1) em amostras de salada ibérica. As amostras não satisfatórias ocorreram 24% (2) em salada de alface frisada; 29% (2) em amostras de salada de alface iceberg; 24% (2) em amostras de salada ibérica e 36% (4) em amostras de salada camponesa (Figura 3.4).



**Figura 3.4. Percentagem de resultados satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis/potencialmente perigosos de bolor nas várias amostras de saladas prontas-a-consumir analisadas.**

Em relação às leveduras foram detetadas contagens elevadas em todas as amostras analisadas de saladas prontas-a-consumir, mas, segundo os valores Guia, INSA, a maioria desses valores ainda se encontra na gama do aceitável. Assim, os resultados mostraram que 100% (8) das amostras de salada de alface frisada; 100% (7) das amostras de salada de alface iceberg e 100% (6) das amostras de salada ibérica foram consideradas satisfatórias. Já em relação às amostras de salada camponesa os resultados mostraram a existência de 45% (5) de amostras satisfatórias e 55% (6) de amostras não satisfatórias (Figura 3.5).



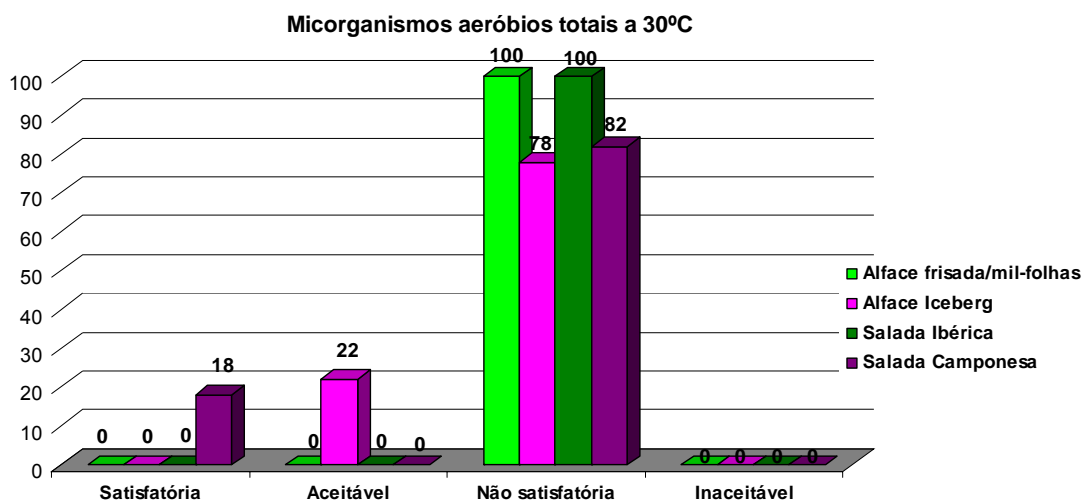
**Figura 3.5. Percentagem de resultados satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis/potencialmente perigosos de leveduras nas várias amostras de saladas prontas-a-consumir analisadas.**

O facto das amostras não satisfatórias se terem verificado somente nas amostras de salada camponesa, parece sugerir que a cenoura, o milho ou a couve roxa possam contribuir de forma

mais expressiva para o aumento das contagens destes microrganismos. Uma contagem elevada de bolores e leveduras em amostras de vegetais minimamente processados pode ser um indicativo de matéria-prima de má qualidade (Nguyen-the & Carlin, 1994; Santos et al., 2010).

### 3.1.4. Microrganismos aeróbios totais a 30 °C

Os resultados obtidos na pesquisa de microrganismos totais a 30 °C mostraram que todas as amostras analisadas de saladas prontas-a-comer apresentaram valores elevados. Com efeito, 100% (9) das amostras de salada de alface frisada, 78% (7) das amostras de salada de alface iceberg; 100% (6) das amostras de salada ibérica e 82% (9) das amostras de salada camponesa foram não satisfatórias; tendo somente 22% (2) das amostras de salada de alface iceberg sido aceitáveis e apenas 18% (2) das amostras de salada camponesa satisfatórias (Figura 3.6).



**Figura 3.6. Percentagem de resultados satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis/potencialmente perigosos de microrganismos aeróbios totais a 30°C nas várias amostras de saladas prontas-a-consumir analisadas.**

Cerna-Cortes et al. (2015), relatou que, num estudo realizado na cidade do México, os microrganismos mesófilos foram detetadas em todas as saladas minimamente processada com limites que variaram entre 3 e 6,6 log ufc/g. Uma pesquisa realizada por Trindade (2014) sobre avaliação da qualidade microbiológica de saladas de alface e de cenoura preparadas em restauração pública em Portugal, mostrou que tanto as amostras de alface como as amostras de cenoura apresentaram índices elevados quanto a contagem de microrganismos totais a 30 °C. Do universo das saladas analisadas 35% das amostras de cenoura e 58% das amostras de alface foram não satisfatórias.

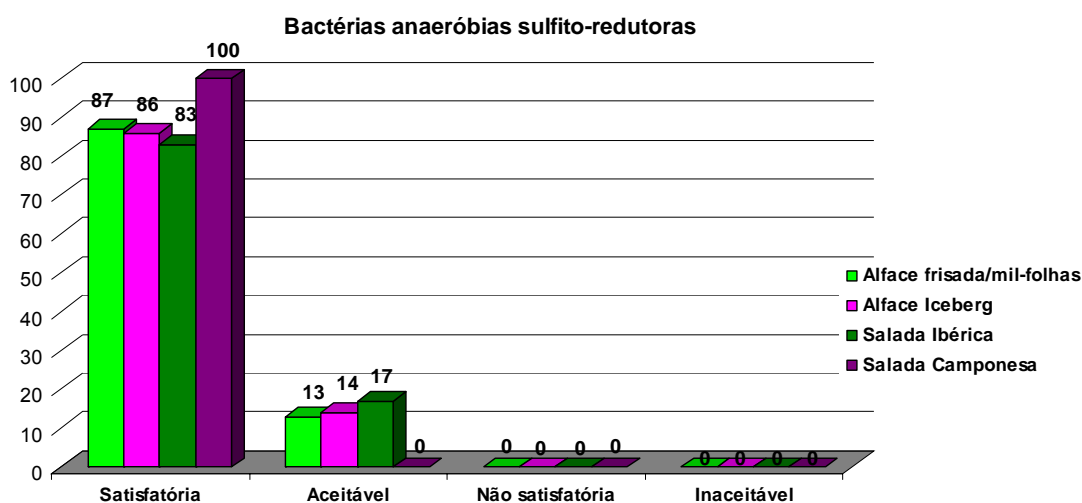
Tanto os resultados obtidos por Trindade (2014) como os resultados obtidos neste estudo indicam uma contaminação elevada dos géneros alimentícios, isto pode estar associado a uma contaminação inicial elevada, procedimentos de higiene inconvenientes ou condições de temperatura imprópria durante o acondicionamento. Com efeito, os microrganismos presentes num dado alimento não só dependem da contaminação microbiana do produto fresco, mas também

de todos os procedimentos efetuados como manipulação do alimento, condições de armazenamento e entre outros (Trindade 2014).

Nos alimentos a microflora instala-se ao longo de toda cadeia ou seja durante a fase de produção, transformação, transporte, distribuição e armazenamento (Filipe, 2005). A enumeração de microrganismos aeróbios a 30 °C é usada como um indicador da população microbiana que existe numa amostra de um alimento. Esta análise microbiológica não é uma avaliação de toda população bacteriana, mas sim um teste geral para os microrganismos que crescem aerobicamente a temperaturas moderadas (25 °C a 40 °C). A contagem de microrganismos totais não diferencia os tipos de bactérias. Este exame microbiológico é utilizado para medir a qualidade sanitária, aceitabilidade organolética e aderência às boas práticas de fabrico e de higiene. Porém esta contagem é um fraco indicador de segurança alimentar pois que não se correlaciona diretamente com a presença de toxinas ou de agentes patogénicos. Uma contagem baixa não significa que o género alimentício esteja livre de organismos causadores de doenças. No entanto uma enumeração elevada revela riscos potenciais para a saúde, e, além disso, pode revelar informações sobre a vida de prateleira de um alimento (FAO, 2016; Coniglio et al., 2016).

### 3.1.5. Bactérias anaeróbias sulfito-redutoras

A pesquisa de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras mostrou a ausência destas bactérias na maioria das amostras analisadas de saladas minimamente processadas. Mesmo nos casos em que estas foram detetadas os valores das contagens foram sempre considerados satisfatórios ou aceitáveis de acordo com os valores Guia estabelecidos pelo INSA. Assim, os resultados indicaram 87% (7) de amostras de salada de alface frisada; 86%(6) de amostras de salada de alface iceberg; 83%(5) de amostras de salada ibérica e 100% (9) de amostra de salada camponesa foram satisfatórias e 13% (1) de amostras de salada de alface frisada; 14%(1) de amostras de salada de alface iceberg e 17% (1) de amostras de salada ibérica foram aceitáveis (Figura 3.7).



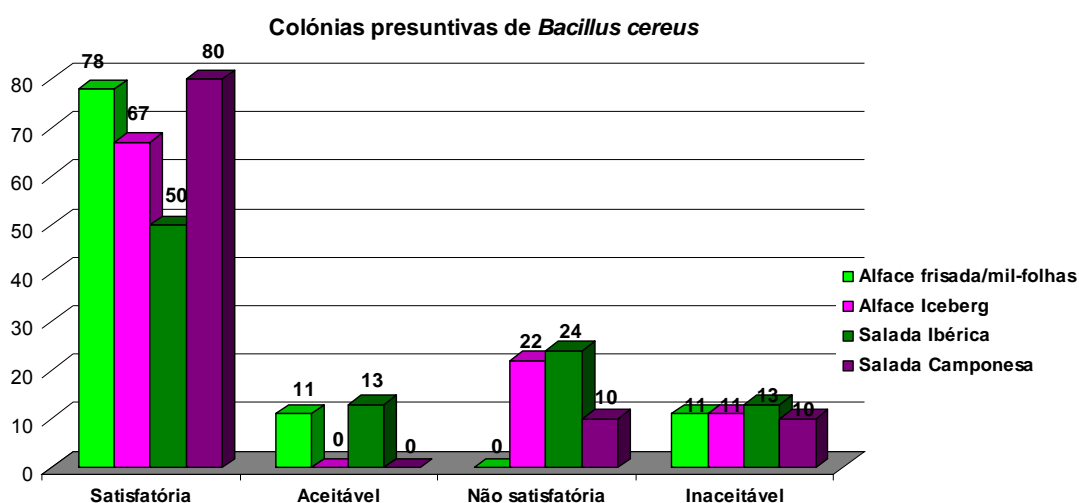
**Figura 3.7. Percentagem de resultados satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis/potencialmente perigosos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras nas várias amostras de saladas prontas-a-consumir analisadas.**



Outro estudo realizado na Sicília (Itália) mostrou a existência de baixa contaminação com este tipo de bactérias em vegetais minimamente processados. Nesse estudo, não foram detetadas bactérias anaeróbias sulfito-redutoras em nenhuma das amostras analisadas (Cardamone et al., 2015).

### 3.1.6. *Bacillus cereus*

Relativamente à presença de *Bacillus cereus* obtiveram-se alguns resultados presumivelmente positivos. Assim, das 36 amostras analisadas, 7 (78%) das amostras de salada de alface frizada; 6 (67%) das amostras de salada de alface iceberg, 4 (50%) das amostras de salada ibérica e 8 (80%) das amostras de salada camponesa foram satisfatórias, e 1 (11%) das amostras de salada de alface frizada e 1 (13%) das amostras de salada ibérica foram aceitáveis. Das restantes amostras 2 (22%) das amostras de salada de alface iceberg, 2 (24%) das amostras de salada ibérica e 1 (10%) das amostras de salada camponesa foram não satisfatórias, e 1 (11%) das amostras de salada de alface frizada, 1 (11%) das amostras de salada de alface iceberg, 1 (13%) das amostras de salada ibérica e 1 (10%) das amostras de salada camponesa foram inaceitáveis/ potencialmente perigosas (Figura 3.8).



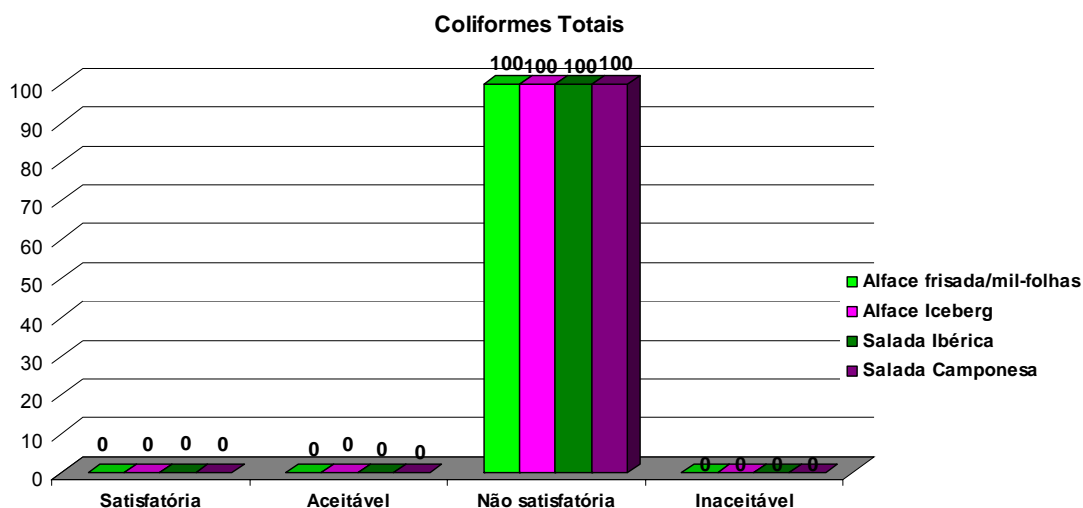
**Figura 3.8. Percentagem de resultados satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis/potencialmente perigosos de *Bacillus cereus* nas várias amostras de saladas prontas-a-consumir analisadas.**

Se os resultados obtidos se confirmarem podem ser preocupantes uma vez que se trata de um microrganismo patogénico detetado em níveis considerados potencialmente perigosos, de acordo com os valores Guia, INSA. Segundo os mesmos valores Guia as amostras não satisfatórias e as inaceitáveis/potencialmente perigosas não estão aptas para o consumo pois que os resultados obtidos se encontraram fora dos limites estabelecidos. No entanto, mais uma vez se ressalva, que as contagens efetuadas podem estar mais altas do que a realidade visto não se ter efetuado o procedimento de confirmação das colónias que apareceram no teste presumitivo.

### 3.1.7. Coliformes totais

Avaliando os valores obtidos na pesquisa de coliformes confirmou-se que todas as amostras de saladas minimamente processadas apresentaram um índice elevado em termos de contaminação com coliformes totais. De acordo com os valores Guia, INSA todas as amostras de saladas analisadas não estavam satisfatórias (Figura 3.9).

Estes resultados apontam para uma elevada contaminação das saladas prontas para comer e podem ser atribuídos a uma contaminação inicial elevada, a ações de higiene inadequadas e condições inconveniente de temperatura durante o acondicionamento. De acordo com Lima et al. (2003) a utilização de soluções cloradas, controle de temperatura e processamento por radiação gama constitui uma combinação de procedimentos que pode contribuir para a melhoria da qualidade microbiológica de vegetais minimamente processados.



**Figura 3.9. Percentagem de resultados satisfatórios, aceitáveis, não satisfatórios e inaceitáveis/potencialmente perigosos de coliformes totais nas várias amostras de saladas prontas-a-consumir analisadas.**

# 4

## CONCLUSÃO

Os vegetais minimamente processados são produtos que apesar de apresentarem alterações físicas, mantêm o seu estado fresco e não necessitam na maioria das vezes de preparação posterior para o consumo.

A crescente procura de vegetais minimamente processados para o consumo, tem sido atribuída aos benefícios que oferecem à saúde, na diminuição de riscos de enfermidades crónicas, em parte devido ao seu teor em vitaminas, fibras e minerais.

A contaminação dos produtos minimamente processados por microrganismos está associada a falhas em sistemas de avaliação e gestão de risco em instalações de processamento, onde as proveniências de contaminação podem ser diversas, nomeadamente do solo, das água de rega e do ambiente de processamento, e, por outro lado, os procedimentos de lavagem e desinfecção podem não facultar uma eliminação completa de patogénicos, sendo imprescindível seguir com precisão as Boas Práticas de Fabrico (BPF) ao longo de toda cadeia alimentar (desde o campo à mesa) a fim de atingir os objetivos da segurança alimentar.

No presente trabalho analisaram-se 37 amostras de saladas minimamente processadas, compostas principalmente por alface ou combinações de alface e rúcula ou alface, cenoura, couve roxa e milho. O objetivo era o de aferir o grau de conformidade destas amostras com os Valores Guia fixados pelo INSA para saladas prontas a consumir.

Todas as amostras analisadas de salada ibérica, camponesa, alface iceberg e alface frisada apresentaram um índice elevado de contaminação para microrganismos aeróbios totais a 30 °C e coliformes totais. Relativamente à presença de leveduras, bolores, *Escherichia coli* e bactérias anaeróbias sulfito-redutoras, a maioria das amostras analisadas apresentaram, resultados aceitáveis ou satisfatórios. No caso particular da *E. coli*, único dos parâmetros analisados com limite legal imposto pelo Regulamento no.1441/2007, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, todas as amostras analisadas se apresentaram conformes. Em relação aos patogénicos pesquisados, nomeadamente *Staphylococcus coagulase positiva* (*S. aureus* e outras espécies) e *Bacillus cereus* também se verificou um número elevado de amostras não satisfatórias. Contudo, estes resultados são apenas indicativos uma vez que, no caso dos *B. cereus* não se procedeu à confirmação das colónias presuntivas, e no caso dos *Staphy-*

*lococcus* coagulase positiva o método utilizado não foi o mais indicado para este tipo de amostras.

O estado microbiológico insatisfatório das saladas minimamente processadas em relação a microrganismos totais foi mais frequentemente observado nas amostras de salada ibérica e de salada de alface frisada o que pode estar relacionado com a morfologia das folhas que auxilie a adesão destas bactérias. Por outro lado, no que diz respeito a bolores e leveduras foram as amostras de salada camponesa aquelas que mais se destacaram pela negativa, tendo apresentado as contagens mais elevadas, sugerindo que a cenoura, couve roxa ou o milho possam contribuir para uma maior contaminação com este tipo de microrganismos.

Os resultados obtidos neste estudo apontam para uma fraca qualidade das saladas minimamente processadas analisadas, em especial no que diz respeito ao nível de microrganismos totais a 30 °C e de coliformes totais. Apesar destas contagens não se correlacionarem diretamente com a presença de toxinas ou de agentes patogénicos, o facto de serem elevadas sugere que seja necessário implementar melhores condições de higiene durante a fase de processamento, armazenagem e distribuição. Contudo, é importante realçar que o número de amostras analisadas foi relativamente reduzido e que esta amostragem foi efectuada no Verão, em dias com temperatura superior a 35 °C, o que pode ter, de alguma forma, contribuído para os resultados obtidos.

Para se conseguir uma maior validação dos resultados e, assim, poder tirar conclusões mais robustas, deveria ser efectuada uma amostragem mais ampla, com um maior número de amostras de cada tipo de salada e com colheitas efectuadas em diferentes alturas do ano para avaliar as situações de sazonalidade da contaminação.

# Referencias Bibliográficas

- Afonso, A., 2008. Análise de perigos. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 5, pp.26–28.
- Almeida, C.R., 1998. O sistema HACCP como instrumento para garantir a inocuidade dos alimentos. *Higiene Alimentar*, 12(53), pp.12–20. Available at: [ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/hidrica/doc/IF\\_HACCP.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/IF_HACCP.pdf).
- Angelotti, R. et al., 1962. Quantitation of *Clostridium perfringens* in Foods. *Applied microbiology*, 10(3), pp.193–199.
- Baptista, P. & Antunes, C., 2005. Higiene e Segurança Alimentar na Restauração- VOLUME II - Avançado. In *Forvisão -Consultoria em formação Integrado*, SA. p. 138.
- Baptista, P. & Linhares, M., 2005a. Higiene e Segurança Alimentar na Restauração VOLUME I - Iniciação. In *Forvisão-consultoria em formação Integrada*, S:A. p. 128.
- Baptista, P. & Linhares, M., 2005b. Higiene e Segurança alimentar na restauração volume I- iniciação. In *Forvisão- consultoria em formação integrada*, S.A. Available at: [http://www.esac.pt/noronha/manuais/restauração\\_VOL\\_1.pdf](http://www.esac.pt/noronha/manuais/restauração_VOL_1.pdf).
- Baptista, P. & Venâncio, A., 2003. “Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos.” In *Guimarães: Forvisão*. p. 109.
- Cardamone, C. et al., 2015. Assessment of the microbiological quality of fresh produce on sale in Sicily, Italy: preliminary results. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 22(1), p.1.
- Cardoso, A.L.S.P. et al., 2001. Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no laboratório de patologia avícola de descavado. *Arquivos do Instituto Biológico*, 68(1), pp.19–22.
- CDC, 2016. List of Selected Multistate Foodborne Outbreak Investigations. 2 de junho. Available at: <http://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html> [Accessed June 4, 2016].
- Cerna-Cortes, J.F. et al., 2015. Microbiological Quality of Ready-to-Eat Vegetables Collected in Mexico City: Occurrence of Aerobic-Mesophilic Bacteria, Fecal Coliforms, and Potentially Pathogenic Nontuberculous Mycobacteria. *BioMed research international*, 2015. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/789508/>.
- Coniglio, M.A., Faro, G. & Marranzano, M., 2016. The Importance of the Microbiological Quality of Ready-to-Eat Salads from a Public Health Perspective. *J Food Process Technol*, 7, p.2. Available at: <http://www.omicsonline.org/open-access/the-importance-of-the-microbiological-quality-of-readytoeat-salads-from-apublic-health-perspective-2157-7110-1000577.pdf>.
- Correia, C.B. et al., 2013. \_ Investigação laboratorial de toxinfecções alimentar (2008-2011).

- Boletim Epidemiológico Observações*, (2.6), pp.3–5.
- Cunha, M.A.D., 2009. Métodos de detecção de microrganismos indicadores. *Saúde & Ambiente Em Revista*, 1, p.1.
- Diffen, 2016. Mold vs. Yeast. Available at: [http://www.diffen.com/difference/Mold\\_vs\\_Yeast](http://www.diffen.com/difference/Mold_vs_Yeast) [Accessed October 31, 2016].
- EFSA, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014 European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control.
- EUFIC, 1998. Processing's role in ensuring Food Safety & Quality. Available at: <http://www.eufic.org/article/en/artid/processing-food-safety-quality-1/> [Accessed May 2, 2016].
- FAO, 2016. Traditional microbiological quality control. Available at: <http://www.fao.org/docrep/003/T1768E/T1768E04.htm> [Accessed November 4, 2016].
- FAO/WHO, 2002. PAN\_European conference on food safety and quality. In pp. 1–233.
- FDA, 2016. Foodborne Illness-Causing Organisms in the U . S . W H A T Y O U N E E D T O K N O W . , p.888. Available at: <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/FoodbornellnessesNeedToKnow/default.htm>, [Accessed June 7, 2016].
- Ferreira, D.A., 2013. Avaliação do efeito de diferentes tratamentos de descontaminação na qualidade de couve-galega minimamente processada Avaliação do efeito de diferentes tratamentos de descontaminação na qualidade de couve-galega minimamente processada.
- Filipe, L.M., 2005. *Aspectos da microbiologia de vegetais para consumo em fresco*. Available at: <http://bibliotecas.utl.pt/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=277237>.
- Foodsafety.gov, 2016. What Government Does. Available at: <http://www.foodsafety.gov/keep/government/> [Accessed May 6, 2016].
- Forsythe, S.J., 2002. “Microrganismos causadores de doenças de origem alimentar.” *Microbiologia da segurança alimentar*. Artmed, pp.164–168.
- Frechaut, T.I.P., 2014. *Validação de metodologia para detecção de Bacillus cereus em arroz e produtos à base de cereais*. Available at: [https://run.unl.pt/bitstream/10362/13048/1/Frechaut\\_2014.pdf](https://run.unl.pt/bitstream/10362/13048/1/Frechaut_2014.pdf).
- Guerra, J.R.N.P., 2015. *Identificação de perigos na cadeia de produção e distribuição de produtos comercializados por uma Empresa do ramo alimentar*.
- ISO 15213, 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs\_ Horizontal method for the enumeration of Sulfitereducing bacteria growing under anaerobic conditions.
- ISO 16649-2, 2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the

- enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli*-Part 2: colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide.
- ISO 21527-1, 2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95.
- ISO 4832, 2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of coliforms-Colony-count technique.
- ISO 4833-1, 2013. Microbiology of the food chain-Horizontal method for the enumeration of microorganisms-Part 1: Colony count at 30°C by the pour plate technique.
- ISO 6888-2, 1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) — Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium.
- ISO 7932, 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of presuntive *Bacillus cereus*, part 6 colony-count technique at 30°C.
- Jay, J.M., Loessner, M.J. & Golden, D.A., 2005. Modern Food Microbiology. *Springer Science & Business Media*.
- Kouassi, K.A. et al., 2011. Prevalence of sulfite reducing *Clostridium* species in barbecued meat in Abidjan , Côte d ' Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 38, pp.2518–2522.
- Lampel, K.A., Al-Khaldi, S. & Cahill, S.M., 2012. Bad Bug Book–Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. *Washington, DC: US Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services*.
- Lima, K.S.C. et al., 2003. Cenouras minimamente processadas em embalagens com atmosferas modificadas e tratadas com radiação gama: avaliação microbiológica, físico-química e química. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23(2), pp.240–250.
- Luzzi, J.C., 2014. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de folhas de louro– *Laurus nobilis* – frente às bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis* . Univates.
- Mallon, C.& Bortolozo, E.A.F.Q., 2004. “Alimentos comercializados por ambulantes: uma questão de segurança alimentar.” *Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde*, 10, p.3.
- Manafi, M. & Siegrist, J., 2011. *Clostridium perfringes* — an Indicator. *Sigma-Aldrich*, 3, pp.1–8. Available at: [http://www.univie.ac.at/hygiene-aktuell/cp paper.pdf](http://www.univie.ac.at/hygiene-aktuell/cp%20paper.pdf).
- Matos, L.R.D., 2014. *Microbiologia Preditiva Aplicada à análise de amostras de carne de vaca e porco*.
- MBL, 2014. Aerobic Plate Count. Available at: <http://mb-labs.com/resources/aerobic-plate-count/> [Accessed November 4, 2016].

- MDH, 2016. Coliform Bacteria. Available at: <http://www.health.state.mn.us/divs/eh/water/factsheet/com/coliform.html> [Accessed November 2, 2016].
- MDH, 2007. Prevent Cross-Contamination. *Minnesota Department of Health Consumer Fact Sheet*. Available at: <http://www.health.state.mn.us/foodsafety/clean/xcontamination.html> [Accessed May 9, 2016].
- MerckMillipore, 2016a. Clostridia & Sulfite Reducing Anaerobic Bacteria. Available at: <http://www.merckmillipore.com/PT/en/products/industrial-microbiology/culture-media/culture-media-for-food-and-beverage-industry/dehydrated-culture-media/enrichment-isolation-differentiation-by-organism/clostridia-sulfite-reducing-anaerobic-bacteria/guKb.qB.0X4AAAFAnhE.1Zwo,nav?ReferrerURL=https://www.google.pt/> [Accessed November 11, 2016].
- MerckMillipore, 2016b. Coliforms, E. coli & Enterobacteriaceae. Available at: <http://www.merckmillipore.com/PT/en/products/industrial-microbiology/culture-media/culture-media-for-food-and-beverage-industry/dehydrated-culture-media/enrichment-isolation-differentiation-by-organism/coliforms-e.coli-and-enterobacteriaceae/RaGb.qB.O6oAAAFaQBE.1Zwo,nav> [Accessed November 11, 2016].
- Merieux nutrisciences, 2014. 10 Key Things You Should Know About Yeast and Mold. *18 de julho*. Available at: <http://foodsafety.merieuxnutrisciences.com/10-key-things-you-should-know-about-yeast-and-mold> [Accessed October 31, 2016].
- MN, 2014. Controlling Mold Contamination in the Plant Environment. *13 de Março*. Available at: <http://foodsafety.merieuxnutrisciences.com/controlling-mold-contamination-plant-environment> [Accessed October 31, 2016].
- New York State Department of Health, 2011. Coliform Bacteria in Drinking Water Supplies. Available at: [https://www.health.ny.gov/environmental/water/drinking/coliform\\_bacteria.htm](https://www.health.ny.gov/environmental/water/drinking/coliform_bacteria.htm) [Accessed November 2, 2016].
- Nguyen the, C. & Carlin, F., 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34(4), pp.371–401. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7945895>.
- NHS, 2015. Preventing food poisoning. *23 de fevereiro*. Available at: <http://www.nhs.uk/Conditions/Food-poisoning/Pages/Prevention.aspx> [Accessed May 6, 2016].
- Palú, Â.P. et al., 2002. Avaliação microbiológica de frutas e hortaliças frescas, servidas em restaurantes self-sevice privados, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. *Hig. aliment*, 16(100), pp.67–74.
- Pinto, A., 1996. “Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos.” *Millenium*, pp.91–100.



- Pittwater Council, 2008. Facts☐: Cross Contamination. Available at: [http://www.pittwater.nsw.gov.au/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0005/52484/Fact\\_Sheet\\_Cross\\_Co ntamination.pdf](http://www.pittwater.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0005/52484/Fact_Sheet_Cross_Co ntamination.pdf) [Accessed May 9, 2016].
- Ragaert, P. et al., 2004. Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. *Food Quality and Preference*, 15(3), pp.259–270.
- Rentokil, 2016. 10 Ways To Ensure Food Safety. 8 de Março. Available at: <http://www.rentokil.com/blog/ensure-food-safety/#.VyuRloQrLIV> [Accessed May 2, 2016].
- Ribeiro-Furtini, L., L. & ABREU, L.D., 2006. Utilização de APPCC na indústria de alimentos. *Ciência Agrotécnica*, 30(2), pp.358–363.
- Sabbithi, A. et al., 2014. Microbiological Quality of Salads Served along with Street Foods of Hyderabad, India. *International Journal of Microbiology*, 2014, p.6. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2014/932191/>.
- Santos, M. et al., 2005. Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. *Revista da ordem dos Farmacêuticos*, 64, pp.66–68.
- Santos, T.B.A. et al., 2010. Microrganismos indicadores em frutas e hortaliças minimamente processadas. *Braz. J. Food Techn*, 13, pp.141–146.
- Silva, E. de O. et al., 2011. Processamento Mínimo de Produtos Hortifrutícolas. Available at: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Doc139.pdf>.
- Soares, E., 2007. “Doenças de origem alimentar: infecções e intoxicações.” *Segurança e qualidade alimenta*, 2, pp.6–8.
- Soncy, K. et al., 2015. Hygienic\_quality\_of\_ready-to-eat\_salads\_sold\_in\_th - Atalho. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9, pp.2001–2010.
- Soriano, J.M. et al., 2000. Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. *International journal of food microbiology*, 58(1), pp.123–128.
- Tonello, C., 2013. *Contaminação microbiológica de presuntos comercializados em um estabelecimento comercial certificado e outro não certificado pelo programa alimento seguro-Pas. Faculdade Assis Gurgacz*
- Trindade, C.H.S.D.R., 2014. *Avaliação da qualidade microbiológica de saladas preparadas em restauração pública.*
- Vasconcelos, E.J.P., 2005. *Produtos minimamente processados.*
- Viegas, S. et al., 2015. \_ Toxinfecções alimentares☐: da investigação à prevenção. *Boletim Epidemiológico Observações*, 4, pp.25–29.
- Viegas, S. et al., 2015. Investigação laboratorial de surtos de toxinfecções alimentares, 2014.

*Boletim Epidemiológico Observações*, 13(5), pp.4–6.

Viegas, S. et al., 2014. Investigação laboratorial de toxinfecções alimentares, 2013. *Boletim Epidemiológico Observações*, 3(7), pp.3–6.

Viegas, S.J., 2009. Alteração do estado de saúde associadas à alimentação. Available at: [http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Documents/AlimentacaoNutricao/Alimentacao\\_INSA\\_online.pdf](http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Documents/AlimentacaoNutricao/Alimentacao_INSA_online.pdf).

Webstaurantstore, 2016. How to Prevent Cross-Contamination. Available at: <http://www.webstaurantstore.com/article/48/preventing-cross-contamination.html> [Accessed May 6, 2016].

Whitehead, A.J., 1998. Ensuring food quality and safety and FAO technical assistance. *Food Nutrition and Agriculture* 21, pp.10–17. Available at: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/w9474t/W9474t03.pdf>.